

N° d'ordre :2364

## THESE

Présentée  
Pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse

Ecole doctorale Biologie, Santé, Biotechnologies  
Spécialité : Biosciences végétales

par

Taissir ABOU AL FADIL

Déterminisme de la tolérance du tournesol à *Phoma macdonaldii* au  
collet et sur racines : approches génétiques et histologiques

Soutenue le 17 juillet 2006 devant la commission d'examen composée de :

M. E. Benizri	Professeur ENSAIA Nancy	Rapporteur
M. S. Mouzeyar	Maître de conférences, Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand	Rapporteur
M. A. Sarrafi	Professeur INP/ENSAT, Toulouse	Examineur
M. C. Roux	Professeur Université Paul Sabatier, Toulouse	Président
Mme E. Mestries	Ingénieur d'études du CETIOM	Examineur
M. G. Dechamp-Guillaume	Professeur INP/ENSAT, Toulouse	Directeur de thèse

*Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse- Laboratoire de Biotechnologie  
Amélioration des Plantes - 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 - Castanet-Tolosan*

## SOMMAIRE

Résumé	1
Abstract	2
Introduction	3
<i>Etude Bibliographique</i>	3
<i>I-Tournesol</i>	6
I-1-Importance économique et valorisation du tournesol	7
I-2-Classification botanique	8
I-3-Description et sélection	9
I-3-1- Le Système racinaire	9
I-3-2-L'appareil végétatif aérien	9
I-3-3-Le système reproducteur	9
I-4-Le cycle de développement et la culture du tournesol	10
I-5-Les principales maladies du tournesol	10
<i>II- Phoma du tournesol</i>	11
II-1-Biologie du champignon	12
II-2-Le cycle de développement	13
II-3-Symptômes sur tournesol	14
II-3-1-Symptômes sur collet	14
II-3-2- Symptômes sur tige	14
II-3-3-Symptômes sur feuille	15
II-3-4-Symptômes sur capitule	15
III-Caractéristiques phénotypiques	16
<i>IV-Modalité de la contamination</i>	16
<i>V- Maladies et sélection variétale</i>	17
V-1-La sélection variétale	17
V-1-1- Amélioration de la qualité et de la productivité	17
V-1-2-Adaptation à l'environnement	18
V-1-3- Résistance aux maladies	18
<i>Matériels et méthodes</i>	23
<i>I - Matériel biologique</i>	24
1- Matériel végétal (la plante hôte)	24
1-1-Présentation du matériel végétal	24
1-1-1- Géotypes de tournesol	24
1-2-Obtention des plants de tournesol	24
1-2-1- Pour les contaminations sur tige et au collet	24
1-2-2- Pour les contaminations racinaires	25
2- Matériel fongique (agent pathogène)	25
2-1-1-Obtention de souches monospores	25
2-1-2- Conservation des souches	26
3 - Modalités d'infection	26
3-1- Inoculation sur pétiole de cotylédon et sur racines	26

3-2- Inoculation au collet de la plante	27
<i>II – Méthodes</i>	27
1- Croissance radiale de <i>Phoma macdonaldii</i>	27
2- Pycnidiogenèse et pigmentation	28
3-Transformation de <i>Phoma macdonaldii</i>	28
3-1-Tests de sensibilité à l'hygromycine	28
3-2-Transformation de <i>Phoma macdonaldii</i>	28
3-3-La culture bactérienne	29
3-4-Le champignon à transformer	29
3-5-La transformation	29
<i>III- Techniques de microscopie</i>	30
1- Préparation des objets	30
2- Techniques d'imagerie	31
<i>IV- Génétique</i>	32
IV-1-Amélioration de la carte génétique du laboratoire BAP	32
IV-2- Détection des QTLs	33
IV-3- Croisements diallèles	33
IV-4-Analyse diallèle selon Griffing	33
 <i>Variabilité Phénotypique</i>	36
Introduction	37
I - Matériel biologique	39
I-1 - Choix des souches de <i>Phoma macdonaldii</i>	39
I-2 - Souches de <i>Phoma macdonaldii</i> exprimant le gène de la GFP.	39
II - Résultats expérimentaux	39
II-1 - Caractérisation phénotypique des souches sauvages et GFP	40
II-1-1 - Croissance radiale des souches sauvages	40
II-1-2- Croissance radiale des souches transformées de <i>Phoma macdonaldii</i>	40
II-1-3- La sporulation des souches sauvages	41
II-1-4- La sporulation des souches transformées de <i>Phoma</i>	41
II-1-5- Pigmentation des souches sauvages de <i>Phoma macdonaldii</i>	42
II-1-6- Pigmentation des souches de <i>Phoma macdonaldii</i> transformées	42
II-2- Agressivité des souches de <i>Phoma macdonaldii</i>	43
II-2-1- Agressivité au collet	43
II-2-1-1- Agressivité au collet des souches sauvages	43
II-2-1-2- Agressivité au collet des souches transformées.	44
II-2-2- Agressivité sur racines	45
II-2-2-1- Agressivité sur racines des souches sauvages	45
II-2-2-2- Agressivité sur racines des souches transformées	45
<i>Article: Adaptability and virulence specificity in French isolates</i>	46
<i>III. Discussion</i>	70
Étude histologique et cytologique	73
I- L'introduction	74

I-1- Les étapes de l'infection	74
I-2- La colonisation de la plante hôte	75
II- Résultats	78
II-1-Cinétique de pénétration du champignon	78
II-1-1 Infection de plantules de tournesol de la lignée sensible C150	78
II-1-2 Infection de plantule de tournesol de la lignée toléranteC137	80
III- Discussion	82
 <i>Génétique</i>	 93
Introduction	94
Article 1 : Genetic variability and heritability for resistanceto black stem	98
<i>Abstract</i>	99
<i>Introduction</i>	100
<i>Materials and methods</i>	102
<i>Results and discussions</i>	104
<i>References</i>	108
Article 2 : Genetic control of partial resistance to collar and root necrosis	112
<i>Abstract</i>	113
<i>Introduction</i>	114
<i>Material and methods</i>	115
<i>Results and Discussion</i>	118
<i>References</i>	121
Article 3 : QTL mapping of partial resistance to Phoma collar and root	126
<i>Abstract</i>	127
<i>1.Introduction</i>	128
<i>2. Materials and methods</i>	129
<i>3. Results</i>	132
<i>Discussion</i>	134
<i>References</i>	137
<i>Conclusion et perspectives</i>	152
<i>Références</i>	158
<i>Annexes</i>	171



A



C



D

Figure 4 : Symptômes de *Phoma macdonaldii* sur feuille (A), tige (B), capitule sous forme de « patte d'oie »(C) et sur le collet (D).



**Figure 5: Contamination sur tige**



**Figure 6: Contamination sur collet**



**Figure 7 : Contamination sur racine**





Figure 8 : échelle de notation basée sur le pourcentage de pétiole de cotylédon nécrosé après infection par *P. macdonaldii*.



Figure 9 : échelle de notation basée sur le pourcentage de collet nécrosé après infection par *P. macdonaldii*.



Figure 10 : échelle de notation basée sur le pourcentage de racine nécrosée après infection par *P. macdonaldii*.

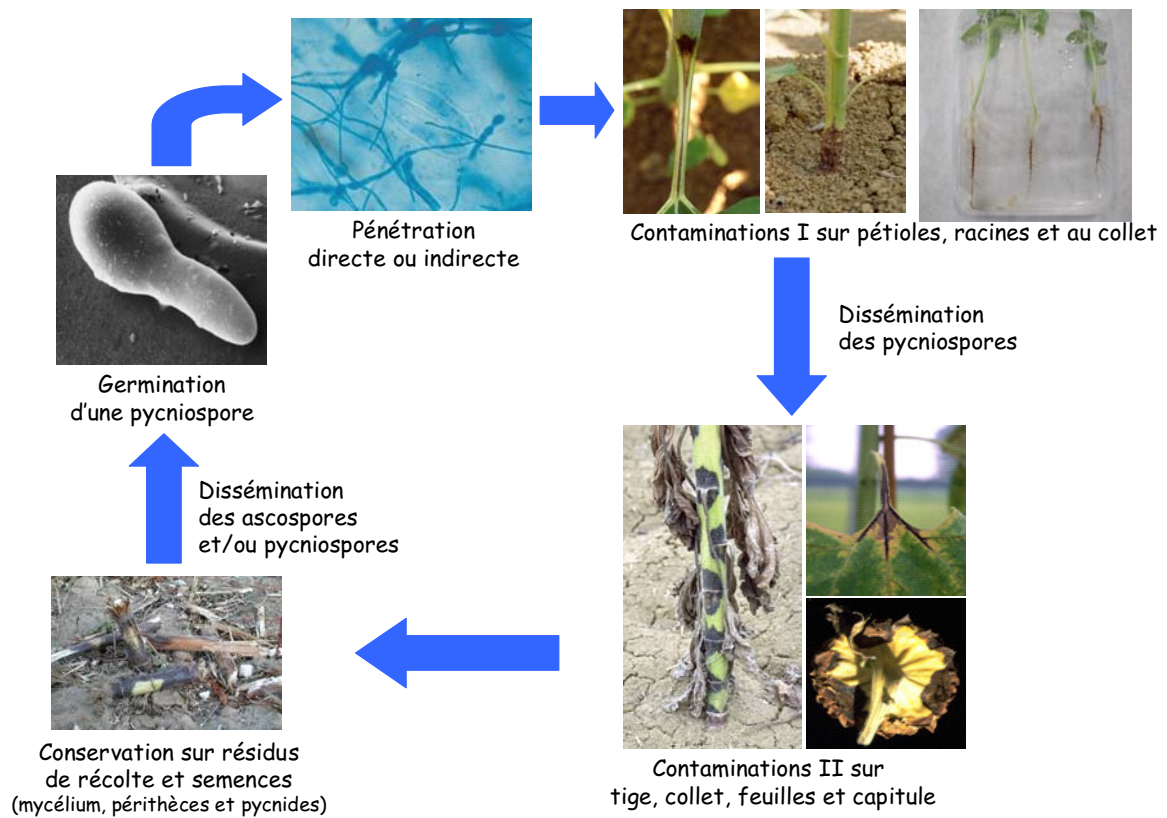
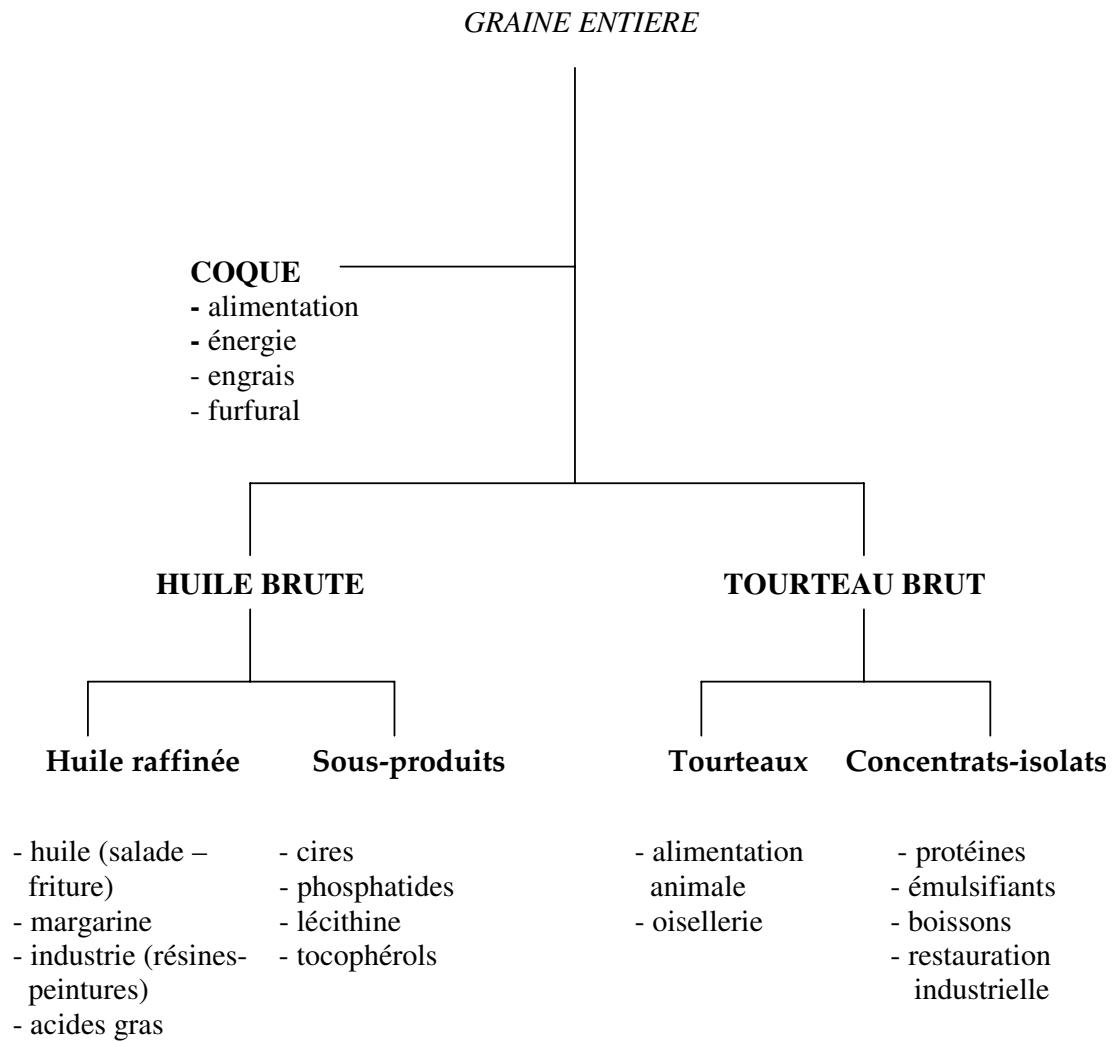


Figure 3 : Cycle biologique de *Phoma macdonaldii* / *Leptosphaeria lindquistii*





**Figure 1 : Valorisation du tournesol (Bonjean, 1986)**

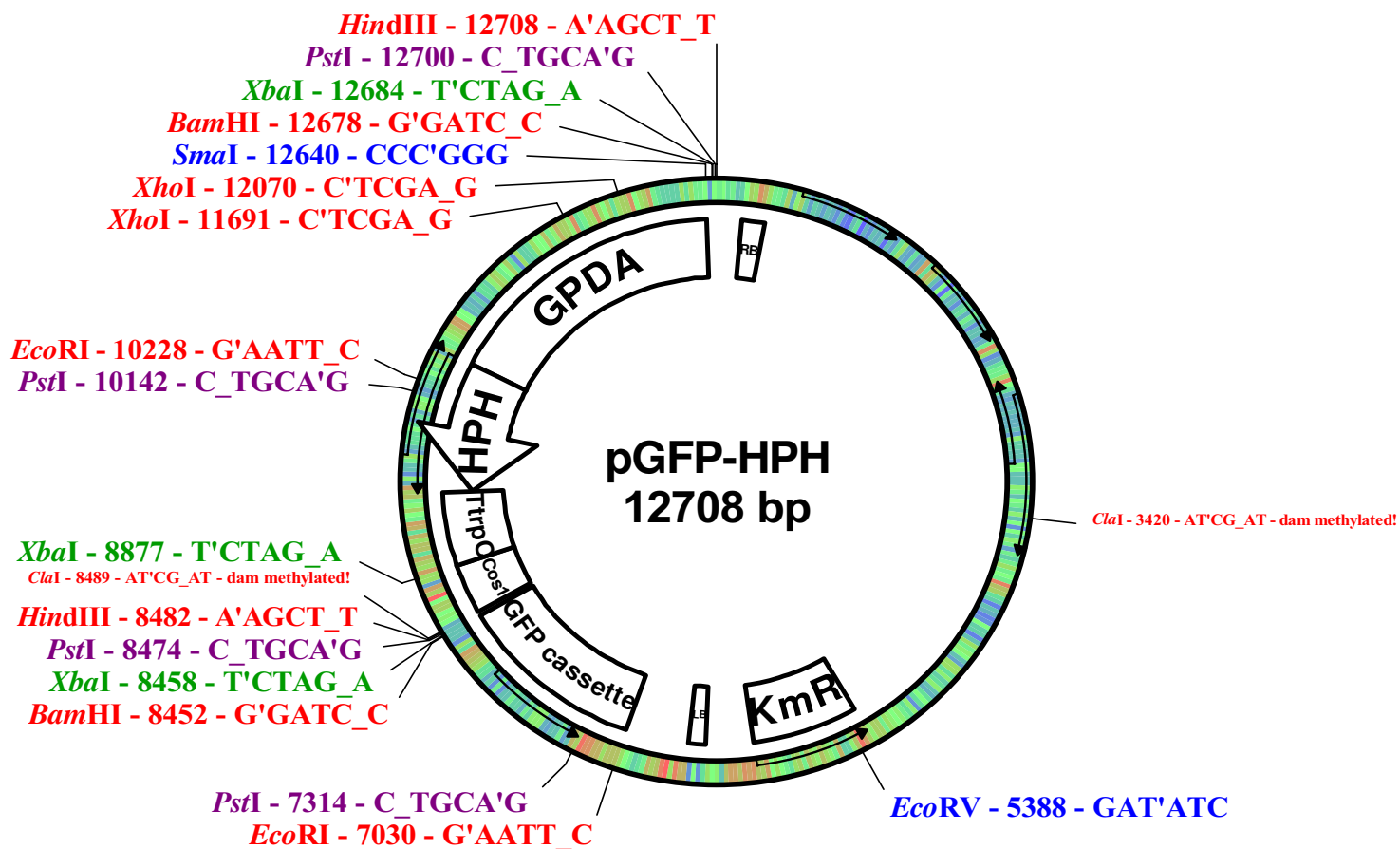


Figure 11 : Carte plasmide pGFP-HPH

## Stades repères du tournesol

Un stade est atteint lorsque 50 % des plantes sont à ce stade.  
Les codes "lettres" ou "chiffres" sont équivalents.









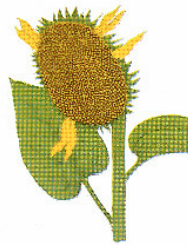



Germination-levée		Phase végétative	Phase bouton floral
			
<b>Stade A1 (1.0)</b> Apparition des hypocotyles en crosse.	<b>Stade A2 (1.1)</b> Emergence des cotylédons et premières feuilles visibles.	<b>Stade B3-B4 (2.3-2.4)</b> La seconde paire de feuilles opposées apparaît et a environ 4 cm de long ; les pétioles sont visibles du dessus.	<b>Stade E1 (3.1)</b> Apparition du bouton floral étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles : STADE BOUTON ÉTOILÉ.
Phase bouton floral		Floraison	
			
<b>Stade E2 (3.2)</b> Le bouton se détache de la couronne foliaire, les bractées sont nettement distinguables des feuilles. Son diamètre varie de 0,5 à 2 cm.	<b>Stade E4 (3.4)</b> Le bouton est nettement dégagé des feuilles, son diamètre varie de 5 à 8 cm, il demeure horizontal. Une partie des bractées se déploie.	<b>Stade F1 (4.1)</b> Le bouton floral s'incline ; les fleurs ligulées sont perpendiculaires au plateau.	<b>Stade F3.2 (4.3)</b> Les trois cercles de fleurons les plus externes ont leurs anthères visibles et dégagées et leurs stigmates déployés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères visibles et dégagées.
Maturation			
			
<b>Stade M0 (5.0)</b> Chute des fleurs ligulées. Le dos du capitule est encore vert.	<b>Stade M2 (5.2)</b> Le dos du capitule est jaune. Les bractées sont aux 3/4 brunes. L'humidité de la graine avoisine 20-25 %.	<b>Stade M3 (5.3)</b> Le dos du capitule est marbré de brun. Les bractées sont brunes. La tige se dessèche. L'humidité de la graine avoisine 15 %.	<b>Stade M4 (5.4)</b> Tous les organes de la plante sont bruns foncés. L'humidité de la graine avoisine 10 %.

Figure 2 : Cycle végétatif du tournesol (CETIOM, 2000)

## Résumé

La maladie des taches noires du tournesol, ou *Phoma* du tournesol, est en constante progression en France depuis les années 1980. Elle a été classée, en 2004, deuxième maladie plus importante après le Mildiou. Elle provoque des pertes de rendement qui peuvent atteindre jusqu'à 70% lorsque l'agent pathogène, s'attaquant au collet de plantules, est à l'origine d'une sénescence prématurée de la plante. Les études réalisées à ce jour portent essentiellement sur la contamination du tournesol par *Phoma macdonaldii* au niveau de la tige. Des études génétiques ont mis en avant une résistance partielle de type polygénique. Cependant, aucun travail n'a été réalisé sur les attaques de *Phoma* au niveau des racines et du collet.

**Nos travaux, ont permis de mettre en exergue différents points :**

- Grâce à la mise au point d'un test de contamination racinaire et au collet à la transformation de souches de *Phoma macdonaldii* avec une protéine verte fluorescente (GFP), nous avons pu mener une étude histologique et cytologique de l'interaction au niveau racinaire et collet. Cette étude nous a permis de suivre la mise en place et le développement de l'infection, et a révélé que des contaminations racinaires pourraient être à l'origine de contaminations au collet.
- L'étude de l'interaction entre 4 génotypes de tournesol et 10 souches monospores de *Phoma macdonaldii* sur tige, collet et racine a par ailleurs permis de mettre en évidence que la réaction de la plante hôte pouvait varier selon l'organe infecté. Aucune corrélation n'a pu être détectée entre les réponses de certains génotypes aux attaques sur racines, collet et tige, rendant nécessaire l'évaluation de la résistance aux différents types d'attaque.
- La variabilité génétique de la résistance partielle à la maladie des tache noires a été étudiée à partir de 88 familles F3 provenant de croisement entre le génotype AS-613 et son mutant M3-8. La différence significative entre le deux parents montre l'existence d'un changement concernant la résistance partielle au *Phoma* chez le mutant M3-8. La comparaison entre le meilleur parent et 10% des familles F3 sélectionnées (gain génétique), prouve la nature polygénique de la résistance partielle à cette maladie.
- Le contrôle génétique de la résistance partielle du tournesol au *Phoma macdonaldii* suit à une contamination sur collet et racinaire a été étudié sur plusieurs lignées de tournesol et leurs hybrides F1 face à 4 isolats différents de *Phoma macdonaldii* dans un programme de croisements diallèles. L'importance des aptitudes générale et spécifique à la combinaison dans le contrôle génétique à cette maladie a été démontée par cette étude.
- A partir d'une carte génétique réalisée au laboratoire, nous avons également pu identifier des QTLs impliqués dans la résistance du tournesol au *Phoma*, sur collet et racines. Certains de ces QTLs sont impliqués dans la résistance de l'hôte à différentes souches de l'agent pathogène, alors que d'autres sont spécifiques d'un isolat donné.

## Abstract

The black stem disease of sunflower '*Phoma macdonaldii*' has been spreading steadily since 1980 and it is actually the second most serious diseases of sunflower after mildew in France. It causes premature ripening resulting in yield losses up to 70% when the pathogen infects the collar of seedlings. Previous studies for partial resistance in sunflower to *Phoma* black stem have been performed by infection of cotyledon petioles with *Phoma* spores. They revealed the existence of a polygenic partial resistance to *Phoma* in sunflower. As far as we know, partial resistance to collar and root necrosis has not been reported in the literature.

In order to study the resistance of different genotypes to the disease, several experiments were undertaken which are:

- Using a method of inoculation on collar and root with a transformed isolate of *Phoma macdonaldii* with GFP, we studied the interaction of *Phoma* on collar and root. This study helped us to understand the developpement of isolates in infected tissue. We suggest by this study that, infected root may cause collar infection in sunflower

- In another experiment, the interaction between 4 genotypes of sunflower and 10 isolates of *Phoma* on shoot, collar and root was studied. We highlighted for the first time that response of plant to *Phoma* vary depending infected tissue.

- Using 88 F3 families coming from a crass between AS-613 and its Mutant lime M3-8, genotype variation for resistance to black stem was studied. Significant difference between AS-613 and M3-8 showed that mutation has changed resistance to *Phoma*. A comparison between the best parent and 10% selected F3 families revealed the polygenic nature of resistance.

- Genetic control of partial resistance to *Phoma macdonaldii* was also studied using some sunflower lines and their F1 hybrids for collar and root infection with 4 isolates of *Phoma* using a Diallel cross. We showed that general combining ability (GCA) is important to control of resistance to *Phoma macdonaldii*.

- Finally using a genetic map of our laboratory, we identified the QTLs involved in resistance to *Phoma* on collar and root. Some of QTLs control resistances to different isolates but some others are specific to a given isolate.

## Introduction

*Phoma macdonaldii* est un champignon pathogène responsable de la maladie des taches noires du tournesol.

Depuis son apparition en France au début des années 1990, cette maladie cryptogamique a évolué : après les attaques sur tiges, ce sont des attaques au niveau du collet, plus nuisibles, qui ont été observées dès 1996. La contamination du collet et des racines peut en effet entraîner une sénescence prématurée de la plante alors que celle de la tige induit un dessèchement foliaire ayant de fortes conséquences sur le remplissage des graines en huile et en protéines

Cette maladie peut entraîner des chutes de rendement de l'ordre de 10 à 30% (Maric *et al.*, 1987 ; Penaud, 1996) voire jusqu'à 70% quand l'agent pathogène occasionne une sénescence prématurée de la plante (Smolik *et al.*, 1983).

Les méthodes de lutte sont limitées : les traitements fongicides ne sont que très partiellement efficaces et il n'existe pas de variétés résistantes à la maladie. De plus, on ne dispose que de peu de données concernant cet agent pathogène.

Le but de ce travail est donc de contribuer à une meilleure connaissance du pathosystème *Phoma*/Tournesol.

Pour cela, il faut tout d'abord connaître le développement de l'agent pathogène sur le tournesol et déterminer comment ce dernier peut lutter contre lui. La maladie doit être considérée comme une relation dynamique qui s'établit entre la plante hôte et l'agent pathogène. Le caractère dynamique de cette interaction peut résulter de facteurs inhérents tant à la variabilité de l'agent pathogène (notamment en terme d'agressivité) qu'à celle de l'hôte (en particulier le degré de résistance ou de sensibilité à la maladie). Le plus souvent, l'évolution de la relation entre l'hôte et le parasite est déterminée par l'environnement qui peut agir favorablement ou non sur l'hôte et sur l'agent pathogène par l'intermédiaire de ses composantes biotiques et



abiotiques. Ainsi, il est indispensable de prendre en considération ces composantes lorsque l'on veut étudier une maladie. Pour ce faire, il est essentiel de caractériser l'agent pathogène, notamment au niveau de composantes phénotypiques telles que la production de spores et l'agressivité. Les modalités de l'infection doivent aussi être déterminées en vue notamment d'établir la cinétique de développement de la maladie. Enfin, le déterminisme génétique de la résistance du tournesol à la maladie peut être appréhendé sur la base d'un pathosystème bien caractérisé.

Dans ce but, nous avons successivement étudié :

1. La variabilité phénotypique de souches sauvages et de souches transformées avec le gène de la GFP de *Phoma macdonaldii*.
2. L'adaptabilité et la spécificité de la virulence de *Phoma macdonaldii*
3. La mise en place au niveau histologique et cytoologique, du développement de la maladie, sur deux lignées de tournesol C137 (tolérante) et 150 (sensible) avec une souche de *Phoma macdonaldii* que nous avons transformées avec le gène de la GFP.
4. Enfin, le déterminisme génétique de la résistance du tournesol au Phoma avec :
  - l'évaluation de la variabilité génétique et de l'héritabilité pour la résistance du tournesol aux attaques au collet et sur racines :
    - à partir de 88 lignées F3 et leurs deux parents AS613 et M3-8,
    - par une approche diallèle sur 5 parents et 10 F1.
  - l'étude de l'interaction entre 4 géotypes de tournesol et 10 souches monospores de *Phoma macdonaldii* sur tige, collet et racines.
  - la recherche de QTLs impliqués dans la résistance au collet et sur racines, basée sur 98 lignées recombinantes sur collet et 83 lignée sur racine et leurs deux parents 'PAC-2' et RHA-266', avec l'exploitation d'une nouvelle carte génétique du tournesol.

# ***Etude Bibliographique***

## ***I-Tournesol***

Le tournesol, *Helianthus annuus* L., est natif d'Amérique du nord. Etant donné le grand intérêt que présentait cette plante, les Indiens ont été les premiers à la domestiquer. Les Amérindiens ont ainsi cultivé le tournesol dès le XVI<sup>ème</sup> siècle. Dès lors, ils produisaient de la farine et du pain à partir des graines, ainsi que de l'huile dont ils s'enduisaient les cheveux. Certaines variétés de tournesol, qui avaient la coque colorée par des anthocyanes, étaient utilisées comme source de teinture.

Les Espagnols ont introduit le tournesol sur le sol européen pour la première fois au XVI<sup>ème</sup> siècle. L'intérêt de cette plante était surtout esthétique puisqu'elle était utilisée comme plante ornementale d'abord en Espagne, puis en France et en Italie, et enfin sur presque tout le continent européen. Ce n'est qu'au XVIII<sup>ème</sup> siècle que l'intérêt alimentaire et oléagineux du tournesol s'est révélé, notamment avec la sélection de variétés à gros capitules et à grosses graines pour l'alimentation humaine, ainsi que la sélection massale de variétés à forte teneur en huile. C'est vers 1830-1840 que la trituration se fait à l'échelle industrielle en Russie où le développement des variétés de tournesol riches en huile a servi à de nombreux programmes de sélection.

A partir de 1960, avec l'exploitation de la vigueur hybride et surtout grâce à la découverte de la stérilité male cytoplasmique (Leclercq, 1969) ainsi que de celle des gènes de restauration de la fertilité, la culture du tournesol, et par la même la production mondiale et l'industrie semencière, se sont fortement développées.

Aujourd'hui, les variétés cultivées atteignent des teneurs en huile supérieures à 40%. Sous des climats tempérés, cette huile se compose de 75% d'acide linoléique et 20% d'acide oléique. L'acide linoléique est utilisé essentiellement pour l'assaisonnement et la margarine.

Sous le climat chaud, ces valeurs s'inversent avec 60% d'acide oléique et 30% d'acide linoléique. L'acide oléique est recherché pour la lipochimie (cosmétique, pharmacie, lubrifiant). Selon Gigandon et Merrien (2000), la teneur en huile est

déterminée par des gènes dominants fortement influencés par la température et donc difficilement sélectionnable par les techniques classiques d'amélioration.

### ***I-1-Importance économique et valorisation du tournesol***

La production mondiale du tournesol a fortement progressé pour passer de 18,5 millions de tonnes en 1985 à 27,6 en 2005 (source : FAO). Les principaux pays producteurs sont l'Argentine, l'ex-URSS et l'Union Européenne avec 3,57 millions de tonnes en 2005. La France est en première place européenne avec 1,45 millions de tonnes devant la Hongrie qui produit 1,27 millions de tonnes (Agreste novembre 2005).

En 2005, la surface de production de tournesol atteignait 644 milliers d'hectares en France et 1890 milliers d'hectares dans l'ensemble de l'Union Européenne. Avec un rendement moyen de 24,5 q/ha (le meilleur résultat des pays producteurs de tournesol) et une production de 1,45 million de tonnes, la récolte de tournesol en France ne reculerait que légèrement.

Les débouchés de la culture du tournesol sont assez diversifiés (Fig.1). Dans le cadre du développement des biocarburants, le tournesol (huile, ester méthylique) présente de nombreux atouts, à commencer par un rendement énergétique remarquable et une moindre émission de gaz à effet de serre par rapport aux carburants fossiles. Le tournesol oléique est plus spécialement recherché pour la production de biocarburants, car l'indice d'iode de l'oléique est très inférieur à celui du tournesol classique. A l'horizon 2010 au moins 300 000 ha de tournesol oléique seront requis en France pour cette utilisation, suite aux investissements de la filière en Diester (biodiesel) dans le Sud de la France. Sa culture est possible soit sur jachère, soit sur la surface primée. Les variétés à haute teneur en acide oléique offrent également des applications prometteuses dans le domaine des biolubrifiants. Cet usage est lié à la stabilité thermique élevée des huiles très riches en acide oléique (plus de 90 %). Ces variétés peuvent alors être cultivées sur jachère (industrielle). En ce qui concerne les débouchés alimentaires du tournesol oléique, les besoins en 2010 sont estimés à 150 000 ha.

La culture du tournesol présente donc de nombreux atouts agronomiques et environnementaux, et ses débouchés tendent à se diversifier, tant sur le plan industriel que énergétique. De plus, ses caractéristiques correspondent parfaitement à la demande sociétale actuelle vis à vis de l'agriculture.

### ***I-2-Classification Botanique :***

Le tournesol a été décrit pour la première fois dans l'herbier du botaniste Dodaneus en 1568 sous le nom de *Chrysanthemum perviratum*.

Le mouvement héliotropique de la fleur de tournesol dû à la courbure de la tige lui a valu son nom botanique d'*Helianthus* (du grec helios : soleil et anthos : fleur), *annuus* étant lié à sa durée de vie annuelle.

C'est une espèce diploïde ( $2n = 34$  chromosomes) et annuelle. Le genre *Helianthus*, originaire d'Amérique du Nord, renferme plusieurs espèces réparties en 4 sections selon la classification de Heiser (1969) nommées *divaricati* (30 espèces), *annui* (13 espèces), *ciliares* (6 espèces) et *fruticosi* (17 espèces). Deux espèces sont exploitées à des fins alimentaires : *tuberosus* L. (le topinambour) et *annuus* (le tournesol cultivé).

D'après Chadeaud et Emberger (1960), le tournesol cultivé *Helianthus annuus*

- L. appartient :
- à l'embranchement des Spermaphytes,
  - au sous-embranchement des Angiospermes,
  - à la classe des Dicotylédones,
  - au phylum des Pariétales-Rhoeadales-Synanthérales,
  - à la famille des Astéracées ou Composées,
  - à la sous-famille des Tubuliflores,
  - au genre *Helianthus* L.,
  - à l'espèce *annuus*.

### ***I-3-Description et sélection***

Le rôle déterminant joué par les différentes parties de la plante dans l'établissement des relations entre l'hôte et ses parasites justifie la description morphologique du tournesol.

#### ***I-3-1-Le système racinaire :***

Le système racinaire du tournesol est de type pivotant. Les racines secondaires forment un chevelu racinaire dense qui occupe un volume important du sol, permettant ainsi une grande résistance à la sécheresse. Le pivot peut atteindre 60 à 70 cm de profondeur mais sa croissance est dépendante des conditions du sol. En effet, le moindre obstacle peut entraver sa croissance ; le travail du sol est donc un facteur non négligeable de la culture du tournesol.

#### ***I-3-2-L'appareil végétatif aérien :***

Le tournesol cultivé est non ramifiée, cylindrique, de hauteur et de diamètre variables, portant un capitule unique. Les feuilles sont cordiformes et alternes selon une phyllotaxie en spirale au delà des cinq premières paires de feuilles qui, elles, sont opposées. Leur nombre et leur taille sont variables.

La tige est cylindrique et plus ou moins pubescente selon les génotypes. Elle mesure de 1 à 4 cm de diamètre et de 50 à 300 cm de hauteur. Les feuilles les plus grandes sont à une hauteur intermédiaire et jouent un rôle important dans la formation et l'accumulation des réserves lipidiques.

#### ***I-3-3-Le système reproducteur :***

Le capitule mesure à maturité entre 5 à 50 cm de diamètre. A sa périphérie se trouvent des fleurs ligulées, stériles, de couleur jaune, dont le rôle principal est d'attirer les insectes. Au centre, des fleurs tubulées et hermaphrodites assurent la reproduction. Après être passées par un stade bouton, les fleurons ont une corolle courte, 2 sépales rudimentaires, 5 étamines à filets libres et à anthères soudés, un



ovaire et un style. Ils sont disposés en hélice qui converge vers le centre du capitule. Le capitule porte 50 à 3000 fleurs. Elles flétrissent rapidement. La floraison s'effectue ainsi sur 10 à 15 jours, de façon centripète.

Comme le tournesol est une plante allogame du fait d'une forte incompatibilité pollinique, la pollinisation doit être majoritairement croisée. Cependant, le caractère d'auto-incompatibilité étant variable, l'intérêt est de cultiver des plantes capables de s'autopolliniser.

Le tournesol est une espèce entomophile : elle a besoin d'insectes tels que les abeilles pour transporter le pollen d'un capitule à l'autre du fait de la morphologie particulière des grains de pollen (gros, ronds, avec des épines) et donc adaptés à ce mode de dissémination. Ainsi, le vent joue un rôle moins important dans la propagation du pollen.

Après la fécondation, la graine, ou akène, se développe et constitue ses réserves protéiques (15 à 21%) puis lipidiques (50 à 54%), le reste correspondant à la coque. Le poids de 1000 grains peut varier de 40 à 200g.

#### ***I-4-Le cycle de développement et la culture du tournesol :***

Le cycle de développement du tournesol varie de 80 à plus de 170 jours selon les géotypes, les conditions climatiques et culturales. Les stades repères du développement du tournesol sont décrits dans la Figure 2. La température minimale de germination est de 6°C.

Le tournesol se cultive préférentiellement sur des sols légèrement acides à neutres, plutôt aérés. Cette culture requiert d'importantes quantités de bore ainsi qu'un sol bien drainé. De ce fait, la préparation du sol est fondamentale car c'est un facteur important du rendement. Une bonne aération va permettre une germination rapide des graines ainsi qu'une croissance régulière et en profondeur du pivot. Avec un appareil racinaire bien développé, l'absorption des minéraux, d'eau et d'azote se fera d'autant mieux. En effet, l'eau et la fertilisation azotée sont des facteurs déterminants pour la culture car l'obtention de graines de bonne qualité dépend de

leur approvisionnement. La culture doit recevoir un apport faible et régulier d'azote et doit éviter tout déficit hydrique. Le désherbage est recommandé car le tournesol est sensible à la concurrence des mauvaises herbes. Le peuplement doit également être régulier.

### ***I-5-Les principales maladies du tournesol***

Le tournesol est sensible à de nombreuses maladies plus ou moins importantes qui sont apparues avec le développement de cette culture. Dans les années 1960, la pourriture grise du capitule (*Botrytis cinerea*), puis le mildiou (*Plasmopara halstedii*) ont causé des dégâts considérables, alors que d'autres maladies telles que la rouille (*Puccinia helianthi*) ou *Alternaria helianthi* étaient sans conséquences notables, ou plus préoccupantes de par leur extension progressive (*Sclerotinia sclerotiorum* et *Macrophomina phaseoli*). Ces vingt dernières années, de nouveaux agents pathogènes ont causés de nombreux dégâts tels que *Phomopsis helianthi* et *Phoma macdonaldii*. Ce dernier s'avère être très préoccupant que ce soit en France ou dans le monde (Penaud & Péres, 1994).

Le tournesol est sensible à d'autres maladies qui peuvent être occasionnées par des champignons également tels que *Verticilium dahliae* Kleb., *Albugo candida*, *Rhizopus*, *Erysiphe*, mais aussi par des bactéries (*Erwinia*, *Pseudomonas*), ou par des plantes parasites comme l'orobanche qui provoque de sérieux dégâts en Europe de l'Est ainsi qu'en Espagne.

### ***II- Phoma du tournesol***

La maladie des taches noires du tournesol, dont l'agent causal est le champignon *Phoma macdonaldii*, devient de plus en plus préoccupante, notamment en France. Elle entraîne une diminution de la qualité des huiles, une diminution du poids de mille grains et des pertes de rendement de l'ordre de 10 à 30%, voire 70% lorsque l'agent pathogène est à l'origine d'une sénescence prématurée de la plante. Elle est actuellement considérée comme la deuxième maladie plus importante en France par les acteurs de la filière tournesol.

Cette maladie est en constante progression en France depuis les années 1990 (Anonyme, 1998). Le reste de l'Europe et du monde est également confronté au développement de cette maladie. Elle a en effet été observée dans de nombreux pays tels que la Yougoslavie, la Bulgarie, la Hongrie, la Roumanie, l'Amérique du sud (Maric *et al.*, 1987), les Etats-Unis (Acimovic, 1984 ; Donald *et al.*, 1986), l'Australie (Acimovic, 1984 ; Miric *et al.*, 1999), la Chine (Hua et Ma, 1996), l'Iran (Madjeidieh-Ghassemi, 1988) ou encore le Pakistan (Siddique-Mirza *et al.*, 1988). Sa présence provoque des pertes allant de 10 à 50% de la récolte ainsi qu'une diminution du taux d'huile (Maric *et al.*, 1987) et du poids de mille grains (Carson, 1991). La contamination s'effectue à tous les stades phénologiques ainsi que sur tous les organes du tournesol.

Le Phoma sur tige est présent sur toute la zone de culture du tournesol. Le phoma du collet, souvent associé au syndrome de dessèchement précoce de la plante est actuellement la forme la plus préjudiciable de la maladie. Une protection fongicide visant spécifiquement le phoma n'est pas, en général, économiquement rentable.

## ***II-1-Biologie du champignon :***

Le champignon responsable des taches noires du tournesol a été désigné par Mac Donald (1964) au Canada et Frezzi (1968) en Argentine sous le nom de *Phoma oleracea* var. *Helianthi-tuberosi*. Plus tard, Boerema (1970), en se fondant sur des critères de forme et de comportement en culture, a conclu qu'il s'agissait plutôt d'une nouvelle espèce de champignon, qu'il a décrit sous le nom de *Phoma macdonaldii* Boerema.

Ce champignon se présente sous deux formes :

Forme sexuée ou parfaite : *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi ;

Forme asexuée ou imparfaite : *Phoma macdonaldii* Boerema.

Les organes de reproduction asexuée sont des pycnides de couleur brun foncé à noir. Elles contiennent les pycniospores. Ces dernières, présentes pendant toute l'année, sont responsables des contaminations primaires et secondaires. Les pycnides,

variables en taille et en nombre selon les souches, libèrent un cirrhe épais de couleur gris blanc à rose.

Les organes de la reproduction sexuée sont des périthèces contenant huit ascospores par asque, généralement pluricellulaires (deux à quatre cellules), responsables uniquement des contaminations primaires. En effet, la forme sexuée apparaît au mois de mars sur les cannes des tournesols ayant passé l'hiver en champ. Les périthèces ont une forme globulaire a col court et sont de couleur foncée. Les asques sont en forme de massue (Penaud et Pères, 1994).

La classification de la forme sexuée et asexuée est la suivante :

	Forme sexuée = téléomorphe <i>Leptosphaeria lindquistii</i> Frezzi	Forme asexuée = anamorphe <i>Phoma macdonaldii</i> Boerema
Embranchement	Eumycètes	Deutéromycètes
Sous-embranchement	Pyrénomycètes	Coelomycètes
Ordre	Pléosporales	Sphaeropsidales
Famille	Pléosporacées	Hyalosporées

Le mycélium est filamenteux, ramifié et cloisonné. Certaines souches peuvent produire des pigments de différentes couleurs (Roustae et al. 2000a).

## ***II-2-Le cycle de développement :***

Le cycle biologique de *Phoma macdonaldii* est représenté sur la figure 3. Le champignon se conserve sur des débris végétaux sous forme de mycélium qui différenciera au cours du temps des pycnides et/ou des périthèces (Maric et al., 1981 et 1987). Il peut survivre ainsi pendant trois ans à la surface du sol, les résidus de récolte constituant la source essentielle des infections. Le Phoma semble également se conserver sur les semences puisque Fayret et al. (1996) ont observé la présence du champignon au niveau du tégument ou de l'amande de la graine. Les pycniospores

comme les ascospores peuvent être à l'origine des contaminations primaires. Les ascospores sont libérées au printemps, l'eau étant indispensable à ce phénomène (Mühlberger, 1996). Elles peuvent être véhiculées par le vent ou par les insectes sur de grandes distances (Gaudet et Schultz, 1984). Pour les pycniospores, qui constituent le principal vecteur de la maladie, la libération se fait dès la fin de l'hiver après la dissolution du cirrhe par la pluie. Les pycniospores, issues des pycnides formées sur les nécroses suite à une contamination primaire, seront à l'origine des contaminations secondaires. Pour que l'infection réussisse, l'atmosphère doit être saturée en humidité pendant au moins 24h lorsque la température est optimale 25°C. La durée de saturation augmente avec la diminution de la température (Fayzalla et Maric, 1981). La contamination du tournesol par *Phoma macdonaldii* peut s'effectuer entre 5 et 30°C (Larfeil, 2003).

### ***II-3-Symptômes sur tournesol :***

Au champ, le tournesol est sensible à la maladie depuis le stade cotylédonaire jusqu'à la floraison, avec une sensibilité légèrement moins forte aux stades précoces. Tous les organes aériens de la plante (collet, tige, feuille et capitule) peuvent être attaqués par le pathogène (Fig. 4)

#### **II-3-1-Symptômes sur collet**

Sur le collet, des macules noires peuvent apparaître très tôt suite à des contaminations très précoces indépendantes du stade de la plante. Ces symptômes entraînent parfois la formation de crevasses profondes. Sur les variétés sensibles, les nécroses sont allongées, crevassées, encerclant la tige et entraînent une sénescence prématurée de la plante (Fig. 4-D).

#### **II-3-2- Symptômes sur tige**

Ils sont caractérisés par des taches noires sur nœud foliaire (Fig. 4-B). Sur les variétés très sensibles, les nécroses au niveau de nœuds très proches se réunissent,

formant parfois des manchons qui entourent la tige. Les symptômes sur cotylédons se présentent sous deux formes principales : des nécroses noires à contours nets qui évoluent rapidement en plages nécrotiques et entraînent le dessèchement des cotylédons (Penaud et Peres, 1994), ou des traits noirs discontinus généralement situés sur la nervure centrale.

La progression de la maladie vers le collet à partir de l'attaque cotylédonaire se fait rapidement, avec préalablement une attaque du noeud correspondant et un passage sur l'hypocotyle. Elle aboutit généralement à la formation d'un manchon noir.

### **II-3-3-Symptômes sur feuille**

Au niveau du limbe foliaire, le développement du Phoma reste limité. Les symptômes débutent sur les feuilles basales les plus âgées sous forme de taches brunes noires discontinues le long des nervures (notamment le long des nervures principales). Lorsque ces taches se réunissent à l'embranchement des nervures principales et du pétiole, un faciès de « patte d'oie » se forme (Fig.4-A). La progression de la maladie le long du pétiole, très souvent sous forme de taches discontinues, entraîne alors le flétrissement et la chute prématurée de la feuille.

### **II-3-4-Symptômes sur capitule**

En période d'humidité intense, après la formation du capitule, des symptômes de coloration noire peuvent apparaître : sur les bractées, au point d'insertion de la tige, sur le capitule. Ces nécroses peuvent alors provoquer rapidement le dessèchement prématuré du capitule lorsqu'elles encerclent la crosse et la tige. Les semences pourront à leur tour être contaminées, permettant ainsi au champignon de se conserver sous forme de mycélium et/ou de pycnides (Fig. 4 -C).



### ***III-Caractéristiques phénotypiques :***

*Phoma macdonaldii* présente une variabilité phénotypique importante, que ce soit au niveau de la croissance radiale ou de la morphologie des colonies et du mycélium (Roustae et al., 2000a et Larfeil, 2003). Une telle variabilité a été observée chez d'autres espèces de *Phoma* (*Phoma lingam* : Hassan et al., 1991 ; *Phoma exigua* : Decognet, 1994 ; *Phoma medicaginis* : Angevain, 1984).

*Phoma macdonaldii* se développe sur des milieux aussi divers que celui de Fries, Malt Agar, Potato Dextrose Agar (PDA), ou V8. Sur un milieu PDA, le mycélium présente généralement une couleur gris-olive caractéristique d'après la nomenclature de Rayner (1970). Certaines souches libèrent des anthraquinones dans le milieu de culture après la lyse du mycélium. On note selon les souches la présence de zones concentriques dues au photopériodisme au niveau desquelles se différencient les pycnides. La croissance des souches est optimale pour des températures 25°C et un pH 6.

La germination des pycniospores s'effectue dans les conditions suivantes : une concentration maximale de 10<sup>6</sup> spores par millilitre, une température comprise entre 15 et 30°C selon l'isolat, un pH de 6 et une humidité relative de 95 à 100%. La germination des pycniospores est photodépendante (Roustae, 1999).

### ***IV-Modalité de la contamination :***

Lors de l'infection de l'hôte (hybride Santiago) au niveau du pétiole du cotylédon, les spores vont adhérer à la surface de l'organe contaminé (Roustae et al., 2000c et Larfeil, 2003). Les pycniospores sont en effet entourées d'un mucilage constitué de polysaccharides qui permet, d'une part, la fixation du champignon sur son hôte et d'autre part, de le protéger des conditions environnementales défavorables telles que la dessiccation. Chez *Phoma macdonaldii*, le mucilage ne présente apparemment aucune activité enzymatique, la cuticule et les parois des cellules épidermiques de l'hôte n'étant visiblement pas altérées sur pétiole de cotylédon après la germination des spores, le mycélium pénètre directement à

travers la cuticule par perforation mécanique, ou indirectement à travers les stomates, en l'absence d'appressorium. Le mycélium se développe dans la paroi des cellules puis dans le cytoplasme. Le plasmalemme se disloque, ce qui se traduit par une perte rapide de l'intégrité des cellules et favorise la colonisation de l'agent pathogène. Des hyphes subcuticulaires ont également été observés dans les pétioles des cotylédons.

Ces caractéristiques sont en partie communes à celles observées chez *Alternaria brassicae* (Tewari, 1986), qui forme des hyphes subcuticulaires, ou chez *Phoma lingam*, qui présente également une adhérence par mucilage et une pénétration à travers les stomates (Abadie et Boudart, 1982) sans formation d'appressorium (Hammond *et al.*, 1985). Ce n'est pas le cas par exemple chez d'autres espèces de *Phoma* telles que *P. exigua* (Decognet, 1994) ou d'autres champignons comme *Phomopsis helianthi* (Muntanola-Cvetkovic, 1989) qui différencient un appressorium, structure spécialisée facilitant la pénétration. Chez d'autres champignons phytopathogènes tels qu'*Erysiphe graminis* ou *Colletotrichum graminicola* (Pascholati *et al.*, 1992 et 1993), les spores sont entourées par un mucilage qui présente une activité enzymatique entraînant la dégradation des parois cellulaires de l'hôte.

## ***V- Maladies et sélection variétale :***

### ***V-1-La sélection variétale :***

La sélection variétale du tournesol touche surtout la qualité des graines (taux de protéines et d'huile, aptitude au décorticage, qualité des huiles) et l'augmentation des rendements (quantité de graines produites à l'hectare, tolérance aux principaux parasites, adaptations environnementales).

#### ***V-1-1- Amélioration de la qualité et de la productivité :***

Les sélectionneurs russes ont été parmi les premiers à obtenir par la sélection massal des plantes produisant un bon taux d'huile. Après l'étude de la descendance, les plantes sélectionnées étaient remises dans la population en cours d'amélioration.

Ce sont ces variétés qui ont été adoptées par le reste de l'Europe et dont l'amélioration a été poursuivie.

De nos jours, des programmes de sélection visent à obtenir des variétés de tournesol riches en acide oléique (jusqu'à 85 ou 90 %) au détriment de l'acide linoléique. D'autres variétés sont sélectionnées pour leur fort taux en protéines.

L'amélioration de la quantité de graines produites s'est faite notamment en augmentant la productivité des plantes grâce à la création d'hybrides qui permettent d'exploiter le phénomène d'hétérosis. Après avoir un temps reposé sur l'emploi de la stérilité mâle génique qui donnait des résultats moyennement satisfaisants, la production d'hybrides est maintenant basée sur l'utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique ainsi que sur celle des gènes de restauration de la fertilité (Leclercq, 1969). La première étape consiste à convertir une lignée mâle fertile de bonne qualité agronomique en une lignée mâle stérile par rétrocroisement (A), la deuxième étape va permettre de maintenir la lignée A par croisement avec sa lignée isogénique (B, dite mainteneuse de stérilité), la troisième étape étant la création de l'hybride par croisement de A avec R (lignée restauratrice de fertilité ou restorer).

### **V-1-2-Adaptation à l'environnement :**

Elle passe par une amélioration génétique, que ce soit pour l'adaptation au milieu ou pour la résistance aux maladies. Les sélectionneurs recherchent des variétés précoces afin d'étendre les zones de production, résistantes à la sécheresse, aux basses températures et à la verse, ou exprimant une sensibilité moins importante face aux carences en bore.

### **V-1-3- Résistance aux maladies :**

Il s'agit de trouver des variétés tolérantes ou résistantes aux agents pathogènes les plus dommageables à la culture. Pour cela, des tests de contamination représentatifs du comportement variétal au champ doivent être mis au point afin de rechercher un matériel végétal ayant un bon comportement face à une maladie

donnée. Ce matériel est alors testé en conditions naturelles et s'il s'avère être intéressant, la « résistance » pourra être introduite dans le matériel végétal productif. Nous allons voir avec les quatre principales maladies du tournesol quelles stratégies peuvent être employées selon le type de résistance impliqué, après avoir rapidement défini ces derniers.

Van der Plank (1968) a classé les relations hôtes/pathogènes en deux grands systèmes, qui, nous le savons maintenant, sont beaucoup plus complexes. Ils mettent cependant en évidence de façon simplifiée les deux grands types de résistance que l'on peut rencontrer.

Dans le premier système, à chaque génotype de l'hôte correspond une race du pathogène. On parle de résistance spécifique ou verticale de l'hôte et de virulence de l'agent pathogène. La résistance est instable car elle est facilement contournable. Elle correspond à une résistance monogénique ou oligogénique qui s'exprime par une réponse de type tout ou rien de l'hôte vis à vis de l'agent pathogène. Le ou les gènes de résistance, souvent dominants, sont faciles à transmettre par rétrocroisement.

Dans le second système, on parle de résistance partielle ou horizontale de l'hôte face à l'ensemble des souches de l'agent pathogène. Ce type de résistance est stable et correspond à une résistance polygénique gouvernée par des gènes mineurs, dont les actions individuelles ou combinées ne donnent qu'une partie de la résistance totale.

### ***1- La résistance à *Plasmopara halstedii* :***

Dans le cas du Mildiou, la résistance est obtenue en introduisant un gène de résistance, ce gène étant dominant et la résistance verticale (Vear et Leclercq, 1971 ; Zimmer et Kinman, 1972). Il existe différentes races de Mildiou, et par la même, plusieurs gènes de résistance différents, le problème étant qu'il apparaît régulièrement de nouvelles races pour lesquelles le gène de résistance sélectionné n'est plus efficace. Ainsi, il n'est pas envisageable d'utiliser seulement un gène de résistance dans les programmes de sélection, il faut en intégrer plusieurs. Cette

stratégie peut augmenter la durée d'utilisation de chaque gène en permettant que la pression de sélection sur la population du pathogène soit la plus faible possible. Un autre problème apparu récemment est la résistance de certaines races du champignon au métalaxyl, fongicide utilisé pour traiter les semences de tournesol contre le Mildiou (Albourie *et al.*, 1998). Dans ce contexte, il est nécessaire d'obtenir dans les futurs hybrides une résistance durable et pour cela, la sélection assistée par marqueur peut être un atout non négligeable (Brahm *et al.*, 2000). Mouzeyar *et al.* (1994) ont mis en évidence l'existence de deux niveaux de spécificité lors des interactions Tournesol/Mildiou : le premier niveau déterminerait la résistance de la plante et le second le type de résistance, c'est-à-dire le mode de propagation du champignon dans la plante. Ils ont également montré que le champignon peut pénétrer dans les variétés résistantes. Bert *et al.* (2001) ont quant à eux identifié un second groupe de liaison présentant des gènes qui participent au contrôle de la résistance au Mildiou. Dans une autre étude réalisée sur 77 lignées recombinantes (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002), il est trouvé 4 QTLs liés à la résistance au Mildiou, dont deux QTLs majeurs qui expliquent 31% de la variabilité phénotypique.

## **2- *Phomopsis helianthi* :**

Dans le cas du phomopsis (agent responsable : *Phomopsis helianthi*) il n'existe pas de résistance complète : il s'agit d'une résistance horizontale mettant en jeu plusieurs gènes. Le but du sélectionneur est alors de repérer les résistances partielles pour les additionner afin d'obtenir du matériel de plus en plus tolérant. Vranceanu *et al.* (1994) ont démontré qu'un petit nombre de gènes était impliqué dans le contrôle de la résistance au Phomopsis, cette dernière étant additive et partielle. Viguié *et al.* (2000) ont confirmé le caractère quantitatif de la résistance avec des effets additifs prédominants. Viguié *et al.* (1999) ont également montré l'existence d'une interaction entre les génotypes de tournesol et les souches de Phomopsis, sans pour autant qu'il y ait d'inversion du classement des hybrides. Degener *et al.* (1999) ont mis en évidence l'absence de corrélation entre la résistance sur tige et sur feuille, ce qui

suggère que les deux facteurs de résistance sont hérités indépendamment. L'aptitude générale à la combinaison de quelques lignées de tournesol ainsi que l'aptitude spécifique de certains hybrides F1, ont des valeurs significatives pour la résistance au *Phomopsis helianthi* chez le tournesol (Deglène *et al.*, 1999). Par ailleurs, Vear *et al.* (1997) ont montré une aptitude spécifique à la combinaison des hybrides F1, non significative pour la résistance à cette maladie chez le matériel utilisé.

### **3- *Sclerotinia sclerotiorum* :**

En France, le tournesol est très sensible à la pourriture blanche ou sclérotiniose (agent causal : *Sclerotinia sclerotiorum*). La sélection variétale est rendue difficile car le niveau de résistance varie selon les organes contaminés et il n'existe aucune corrélation entre ces résistances (Tourvieille & Vear, 1984 ; Castano *et al.*, 1989). Ainsi, il faut considérer que chaque forme d'attaque est une maladie différente : il s'agit alors d'obtenir des variétés ayant une résistance générale satisfaisante. La résistance est polygénique et partielle contrôlée principalement par l'effet additif des gènes stables (Robert *et al.*, 1987 ; Thuault & Tourvieille, 1988 ; Tourvieille & Vear, 1986 ; Castano *et al.*, 1992 ; Vear & Tourvieille de Labrouhe, 1988) et il n'existe pas d'interaction entre les génotypes de tournesol et les souches de *Sclerotinia*. De plus, deux types de résistance ont été mis en évidence : une résistance à la pénétration du champignon et une résistance à la propagation du mycélium (Castano *et al.*, 1993). Le second type de résistance fait intervenir des gènes différents pour chaque organe (Robert *et al.*, 1987), bien qu'il puisse parfois y avoir des gènes qui soient communément impliqués et ce sans relation spécifique avec l'organe infecté (Castano *et al.*, 1993). Mestries *et al.* (1998), par analyse moléculaire, ont montré l'existence de QTLs spécifiques à chaque organe contaminé ainsi qu'une région commune aux deux types de résistance. En plus, Bert *et al.* (2002) ont identifié 15 QTLs pour quatre paramètres de la résistance à *S. sclerotiorum* chez le tournesol.



#### **4- *Phoma macdonaldii* :**

Une analyse QTLs (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002,) a mis en évidence l'existence de 7 QTLs expliquant 92% de la variation phénotypique. Bert *et al.* (2004) ont trouvé 4 QTLs expliquant jusqu'à 38% de la variation phénotypique.

D'après une étude préliminaire réalisée en serre dans notre laboratoire certaines espèces d'*Helianthus* sauvages sont très tolérantes vis-à-vis du phoma. Il s'agit d'*H. rigidus*, *H. petiolaris* ssp *petiolaris* et *H. debilis* ssp *cucumerifolius*. *Helianthus resinosus* ne développe aucun symptôme : il s'agit soit d'une espèce résistante, soit d'une espèce non-hôte. Il pourrait être intéressant d'utiliser ces espèces sauvages comme source de résistance dans les programmes de sélection.

## ***Matériels et méthodes***

# **I - Matériel biologique**

## ***1- Matériel végétal (la plante hôte)***

### **1-1-Présentation du matériel végétal :**

#### **1-1-1- Génotypes de tournesol :**

Les génotypes de tournesol utilisés lors de cette étude :

Hybrides : Melody (NK Semences), DK 3825 (RAGT Semences), Heliasol (Semences de France) et Prodisol (DEKALB).

88 familles F3 et leurs deux parents (la lignée AS613 et le mutant M3- 8 )

98 lignées recombinantes et leurs deux parents (PAC-2 et RHA-266)

15 lignées et leurs 5 parents (AS613, ENSAT-R5, ENSAT-B5, le mutant M6-54-1 et B454/03)

2 lignées C137 et C150

### **1-2-Obtention des plants de tournesol**

#### **1-2-1- Pour les contaminations sur tige et au collet**

Les graines de tournesol sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium à 6 degrés chlorométriques pendant 5 minutes, puis rincées trois fois 5 minutes à l'eau distillée. Les graines sont ensuite semées dans des bacs (48 x 35 x 10 cm) à raison de 20 plantes par bac à 2 centimètres de profondeur. Le semis est réalisé dans du terreau. Les plantes sont ensuite placées au phytotron jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les plantes sont ainsi placées en conditions de jour long (photopériode de 14 heures), sous une intensité lumineuse de  $200 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  jour,  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  nuit et une humidité relative de 75-80%.

### **1-2-2- Pour les contaminations racinaires**

Les graines de tournesol sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium à 6 degrés chlorométriques pendant 20 minutes, puis rincées trois fois 5 minutes à l'eau distillée stérile. Les graines sont déposées à la surface du milieu, dans des boîtes Magenta (3 plantes par boîte) contenant du Phytigel (Sigma) avec 100 ml par boîte de milieu Murashige & Skoog (Duchefa) (Annexe 3). Les boîtes sont ensuite placées au phytotron pour toute la durée de l'expérimentation, en conditions de jour long (photopériode de 14 heures), sous une intensité lumineuse de  $200 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  le jour et de  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  la nuit.

### **2- Matériel fongique (agent pathogène)**

La culture *in vitro* de *Phoma macdonaldii*, pour la production de mycélium et de pycnides, est réalisée sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (Annexe, 1) avec une héméropériode de 12 h ( $37 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Lorsque seule la production de mycélium est souhaitée, la culture du champignon est réalisée sur milieu V8 (Agar 20 g. l<sup>-1</sup>, V8 200 ml. l<sup>-1</sup>, pH6) à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  à l'obscurité (Annexe 1).

#### **2-1-1-Obtention de souches monospores**

Dix souches monospores de *Phoma macdonaldii* ont été préparées à partir de 10 cultures pures de souches polyspores isolées par le CETIOM (Tableau 1). Après photo-induction de la conidiogenèse (héméropériode de 12h), on réalise une suspension conidienne mère dans de l'eau distillée stérile. Par dilutions successives chaque suspension conidienne est amenée à une concentration d'environ 1 pycniospore/ $\mu\text{l}$ . Des gouttes de 1  $\mu\text{l}$  sont déposées sur une lamelle stérilise placée aseptiquement sur une chambre de Van Tieghem afin d'éviter le dessèchement de la préparation microscopique. Après observation au microscope, les gouttes ne renfermant qu'une seule pycniospore sont prélevées à l'aide d'un morceau de papier filtre stérile. Ce fragment de papier filtre est déposé aseptiquement à la surface du

substrat nutritif PDA, et mis à incuber à  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sous un régime photopériodique de 12 heures et intensité lumineuse de  $37 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### **2-1-2- Conservation des souches**

Un disque mycélien provenant d'une culture pure de champignon est déposé sur un milieu PDA. Des fragments de cannes de tournesol sains sont autoclavés (20 min à  $120^{\circ}\text{C}$ ) et sont placés de part et d'autre du disque de mycélium. Après 10 jours d'incubation dans les conditions habituelles en alternance jour/nuit, mycélium et pycnides apparaissent sur les fragments de cannes. Ces derniers sont alors placés dans des tubes à essais stériles contenant du  $\text{CaCl}_2$ . Les tubes sont fermés avec du coton et du Parafilm, puis conservés au réfrigérateur à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Alternativement, les souches de *Phoma macdonaldii* peuvent être conservées à moins  $80^{\circ}\text{C}$  sous forme de suspensions de pycniospores ( $10^6$  pycniospores/ml) contenant 50% de glycérol (Sigma).

## **3 - Modalités d'infection**

### **3-1- Inoculation sur pétiole de cotylédon et sur racines**

Trois ml d'une solution contenant 0.5% de jus d'orange et 0.25% de gélatine, ajustée à pH 6 et autoclavée (Annexe 2) sont déposés à la surface d'une culture de *Phoma macdonaldii* âgée d'environ 10 jours. Par agitation mécanique à la pipette, on obtient une suspension de pycniospores qui est ajustée à la concentration finale de  $10^6$  pycniospores par ml.

Les plantules de tournesol, ayant atteint le stade B2 (deux paires de feuilles), ont été inoculées avec 20  $\mu\text{l}$  d'une suspension de pycniospores ( $10^6$  pycniospores/ml) à l'intersection de l'hypocotyle et du pétiole de chaque cotylédon (Fig 5). Après la contamination, les bacs servant à la culture des plantes sont recouverts d'un couvercle plastique transparent afin de maintenir une humidité saturante pendant 48 heures. La lecture des symptômes est effectuée 7 jours après la contamination. L'échelle de notation (Fig. 8) a été basée sur le pourcentage de la surface nécrosée du

pétiole du cotylédon et a comporté 9 niveaux de 1 à 9 : 1 = 0-5%, 2 = 6-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-30%, 5 = 31-40%, 6 = 41-60%, 7 = 61-80%, 8 = 81-99%, 9 = 100% avec des nécroses sur la tige (Roustae *et al.* 2000a). Les mesures ont présenté une distribution normale et elles n'ont eu besoin d'aucune transformation. Pour les inoculations racinaires, selon l'expérimentation de 2 à 20 µl de la suspension de pycniospores sont déposés, à l'aide d'une seringue, à proximité de la racine principale. La lecture des symptômes (Fig. 10) est effectuée 7 jours après inoculation, en attribuant une note de 1 à 9 : 1 = 0-0,5 cm, 2 = 0,6-1 cm, 3 = 1,1-1,6 cm, 4 = 1,7-2,2 cm, 5 = 2,3-2,8 cm, 6 = 2,9-3,4 cm, 7 = 3,5-4 cm, 8 = 4,1-4,6 cm, 9 = plus de 4,7 cm en fonction du développement du champignon, sur la racine (Abou Al fadil *et al.*, 2006a).

### 3-2- Inoculation au collet de la plante

Un disque de milieu V8 gélosé portant uniquement du mycélium de *Phoma macdonaldii* est prélevé à l'aide d'un emporte-pièce. Cet inoculum est directement appliqué contre le collet de la plante au stade B3-B4 (Fig. 6). Après la contamination, les bacs servant à la culture des plantes sont recouverts d'un couvercle plastique transparent afin de maintenir une humidité saturante pendant 48 heures. L'évolution des symptômes est mesurée 7 jours après inoculation. L'échelle de notation de 1 à 9 (Fig. 9) est basée sur le pourcentage de la surface nécrosée au collet de 1 à 9 : 1 = 0-5%, 2 = 6-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-30%, 5 = 31-40%, 6 = 41-60%, 7 = 61-80%, 8 = 81-99%, 9 = 100% nécrose tout autour de la base de la tige et sur un centimètre de hauteur.

## II – Méthodes

### 1- Croissance radiale de *Phoma macdonaldii* :

La croissance radiale des souches monopycniospores de *Phoma macdonaldii* a été mesurée sur milieu PDA à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  avec une héméropériode de 12 h ou V8 agar à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  et à l'obscurité. Chaque boîte de Petri de 90 mm de diamètre reçoit en son centre un implant mycélien de 6 mm de diamètre. Après 4, 7 et 10 jours de culture, le

diamètre de la culture est mesuré et exprimé en mm. L'expérimentation a été répétée 3 fois avec 5 boîtes de Petri par répétition.

## **2- Pycnidiogenèse et pigmentation**

La pycnidiogenèse des souches monopycniospores de *Phoma macdonaldii* a été mesurée après 10 jours de culture sur milieu PDA à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  avec une héméropériode de 12 h. Chaque boîte de Petri de 90 mm de diamètre reçoit en son centre un implant mycélien de 6 mm de diamètre. Le nombre de pycnides par  $\text{mm}^2$  est comptabilisé en utilisant une loupe binoculaire (10X). L'expérimentation a été répétée 3 fois avec 3 boîtes de Petri par répétition.

La pigmentation des isolats est déterminée à l'aide du code de couleur universel de Rayner (1970).

## **3-Transformation de *Phoma macdonaldii***

### **3-1-Tests de sensibilité à l'hygromycine**

Dans le but de déterminer quelle est la concentration en antibiotique inhibitrice de toute croissance de *Phoma macdonaldii*, une gamme de concentration en milieu culture PDA supplémenté en hygromycine est réalisée. Les différentes concentrations testées sont 0, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 100, 150 et 200  $\mu\text{g/ml}$  d'hygromycine. Un disque de mycélium fait à l'emporte pièce est déposé au centre des boîtes qui sont ensuite incubées à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  avec une héméropériode de 12 h. Le développement du champignon est mesuré 10 jours après le début de l'expérience.

### **3-2-Transformation de *Phoma macdonaldii***

Pour réaliser la transformation de *Phoma macdonaldii*, il faut disposer en parallèle d'une culture bactérienne et d'une culture du champignon à transformer (Mullins *et al.*, 2001)

### 3-3-La culture bactérienne

Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées sont C58C1 et AGL-1. Elles contiennent chacune le plasmide pGFP-hph (Fig. 11). Une pré-culture de chaque souche est réalisée en milieu liquide LB (Difco) additionné de kanamycine à 50 µg/ml, à partir d'une colonie s'étant développé à 28°C pendant 2 à 3 jours (Annexe 4).

Ensuite, une aliquote de 250µl de pré-culture est mise dans 10 ml de milieu liquide AB additionné de 50 µl de kanamycine à 50 µg/ml et les bactéries sont cultivées un jour à 28°C. Afin d'obtenir un culot bactérien, une centrifugation est réalisée à 101g pendant 10 minutes à 20°C. Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans 10 ml de milieu GI (Annexe 5)

Ensuite la DO à 600 nm est mesurée sur une aliquote et une dilution de la suspension bactérienne est réalisée, dans du milieu GI additionné d'acétosyringone à 200 µM, pour obtenir une DO finale comprise entre 0,2 et 2.

### 3-4-Le champignon à transformer,

Trois ml d'eau distillée stérile sont déposés à la surface d'une culture de *Phoma macdonaldii* âgée d'environ 10 jours. Par agitation mécanique à la pipette, on obtient une suspension de pycniospores qui est diluée à  $10^6$  et à  $10^7$  spores/ml dans du milieu GI additionné ou non d'acétosyringone à 200 µM.

### 3-5-La transformation

Un mélange de 500 µL de suspension bactérienne et de 500 µl de suspension de pycniospores, préparées au préalable, est réalisé. Cent microlitres de ce mélange sont étalés sur milieu GI agar additionné d'acétosyringone à 200 µM puis recouverts d'une membrane de cellophane.

Après 2 à 3 jours de co-culture à 22°C, la membrane de cellophane est transférée sur milieu sélectif PDA additionné d'hygromycine à 150 µg/ml, de spectinomycine à 50 µg/ml et de cefotaximine à 50 µg/ml. La membrane de cellophane est retirée du



milieu sélectif après un jour. Une première lecture est faite 3 à 4 jours après le transfert sur milieu sélectif.

Des colonies isolées sont repiquées sur du milieu PDA additionné des 3 antibiotiques et incubées à 24°C.

### ***III- Techniques de microscopie***

#### ***1- Préparation des objets***

Les observations en microscopie optique et confocale ont été faites sur des coupes d'échantillons frais non fixés. Les coupes transversales ou longitudinales ont été réalisées, après enrobage des échantillons dans de l'agarose à bas point de fusion (solution aqueuse d'agarose à 5% p/v), avec un vibratome H1250 (Microcut H1250; Energy Beam Science Inc., St Louis MO, USA). Une contre coloration a été réalisée dans une solution aqueuse, soit avec du bleu Evans (0,1%, p/v, 2 minutes), soit du rouge Congo (0,05%, p/v, 30 secondes). Ces colorations permettent de visualiser les contours des cellules, le rouge Congo étant un colorant sélectif des parois cellulotiques végétales. Les coupes sont ensuite rincées dans l'eau distillée et montées sur lame de verre pour observation.

Les échantillons ( $\approx 1$  cm) pour observation en microscopie électronique à balayage (MEB) sont prélevés de part et d'autre du point d'inoculation. Ils sont fixés au glutaraldéhyde (2,5%, p/v) en solution tampon 50 mM (tampon cacodylate de sodium, pH 7,15), pendant 24 heures à 4°C. Après rinçage dans le tampon, ils sont déshydratés progressivement par des bains de solution d'alcool éthylique (20%, 40%, 60%, 80%, 95%, v/v, 2 fois 30 minutes, et de 2 bains d'alcool absolu de 1 heure). Les échantillons sont alors déshydratés au point critique par substitution de l'alcool par du CO<sub>2</sub> évaporé à son point critique (CPD750 EmScope apparatus). Les échantillons sont montés sur des plots et métallisés par une couche d'or-palladium de 50 nm (modèle, JFC1100 JEOL).

Les échantillons ( $\approx 2$  mm<sup>2</sup>) pour les observations en microscopie électronique à transmission (MET) sont fixés et déshydratés comme indiqué ci-dessus. Ils sont

ensuite infiltrés par des bains de résine LRW (London Resin White, Oxford, UK) de concentration croissante (1/2, 1/1, 2/1, v/v, LRW/EtOH), puis de résine pure (durée de 12 h à 4°C pour chaque bain). Les échantillons en résine pure, placés dans des gélules, sont mis à polymériser pendant 24 h à 70°C. Les coupes semi fines (1 µm d'épaisseur) et ultra fines (80-90 nm) sont réalisées au couteau de diamant à l'aide d'un ultramicrotome (UltraCutE, Reichert-Leica, Germany). Les coupes semi-fines sont montées sur lames de verre et colorées au bleu de toluidine (0,5%, p/v en solution dans un tampon 2,5% sodium carbonate, pH 11). Les coupes ultra fines sont récupérées sur des grilles en or et soumises au test PATAg (periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate reaction) pour visualiser les polysaccharides. Elles sont mises à flotter sur une solution aqueuse d'acide périodique (1%, p/v) pendant 30 minutes à température ambiante. Elles sont abondamment rincées et traitées pendant 12 heures à 4°C par le thiocarbohydrazide de sodium (0.2%, p/v) dans une solution d'acide acétique 20%. Les coupes sont rincées, puis mises à flotter sur une solution de protéinate d'argent (1%, p/v) à température de la lumière et à l'abri de la lumière. Elles sont ensuite rincées et séchées avant observation.

## ***2- Techniques d'imagerie***

Les images en microscopie champ large (fond clair et épifluorescence) ont été obtenues avec un microscope inversé (DM-IRBE, Leica Microsystems, Germany) équipé d'une caméra CCD couleur (Color CoolView, Photonic Science, Milham, UK). Les observations en épifluorescence ont été obtenues en utilisant le cube filtre I3 (excitation filter, BP 450-490 nm, suppression filter LP 515 nm).

En microscopie confocale, les observations sont réalisées avec un microscope confocal spectral à balayage laser (SP2 SE, Leica, Germany) équipé d'un statif droit (DM 6000, Leica, Germany) et des objectifs 10X à sec (HC PL Fluotar, N.A. 0.3) et 40X (HCX PL APO, N.A. 0.8) à immersion eau. La raie à 488 nm du laser argon est utilisée pour visualiser la fluorescence de la GFP détectée dans la bande spectrale 490 nm et 540 nm. Deux diodes lasers sont utilisées pour visualiser l'autofluorescence émise

par les tissus végétaux. La fluorescence, collectée dans la bande spectrale entre 410 et 470 nm (excitation par la raie 405 nm) permet de visualiser les tissus lignifiés. Celle collectée dans la bande spectrale entre 570 et 630 nm (excitation à 561 nm) permet de visualiser les autres tissus. Quand les échantillons sont contre colorés au bleu Evans ou au rouge Congo, seule la diode laser à 561 nm est utilisée et la fluorescence émise, collectée dans la bande spectrale entre 570 nm et 670 nm permet de visualiser les contours cellulaires. Les images sont obtenues par projection maximale de 20 à 30 plans focaux acquis en z avec un incrément de 0,5 à 1  $\mu$ m entre deux plans. L'ensemble des images est traité sous Image Pro-Plus (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

En MEB, les échantillons sont observés avec un microscope électronique à balayage H450 (Hitachi, Japon) sous une tension d'accélération de 15 kV. Les images sont réalisées avec un appareil photo couplé au microscope et les négatifs (Illford 125 ISO) obtenus sont digitalisés au moyen d'un scanner avec une résolution de 400 dpi.

En MET, ils sont observés avec un microscope électronique à transmission Hitachi (H6000, Hitachi, Japan) sous une tension de 75 kV. Les images sont prises sur des plans films (Kodak-Electron films, Kodak France).

## ***IV- Génétique***

### ***IV-1-Amélioration de la carte génétique du laboratoire BAP :***

Flores Berrios *et al.* (2000a) ont construit une carte génétique sur la base de 333 marqueurs AFLPs en utilisant 123 lignées recombinantes qui ont été créées par la méthode SSD (Single Seed Descent) par l'INRA (France) à partir du croisement entre les géotypes 'PAC-2 x RHA-266'. Puis Rachid Alchaarani *et al.* (2002) ont amélioré la carte en ajoutant 38 SSRs. Récemment Poormohammad Kiani *et al.* (2006) ont ajouté 163 SSRs et la carte génétique actuelle du laboratoire contient 331 AFLP et 197 SSRs. Nous avons utilisé cette carte pour notre étude génétique de la résistance à *Phoma macdonaldii*.

#### **IV-2- Détection des QTLs :**

La recherche de QTLs a été effectuée grâce au logiciel QTL-Cartographer version 1.6 en utilisant le modèle 6 (CIM : Composit Interval Mapping) (Basten *et al.*, 1999). Ce modèle prend en considération deux paramètres : le nombre de marqueurs qui contrôlent le fond génétique et la taille de la fenêtre qui limite des deux côtés les marqueurs flanquant le site testé. Cette procédure rend l'analyse plus sensible à la présence de QTLs dans l'intervalle ciblé. A chaque intervalle, le degré de signification des associations entre mesures et marqueurs est estimé par Likelihood Ratio Statistic (LRS) traduit comme le rapport statistique de vraisemblance (Haley & Knott 1992). Ce rapport correspond statistiquement au test  $\chi^2$  (Manly & Olson 1999). Dans cette étude, le nombre de marqueurs constituant le fond génétique était fixé à 15 ( $n_m = 15$ ) et la taille de la fenêtre à 15 ( $w = 15$ ) pour la recherche de QTLs liés à la résistance partielle au phoma.

#### **IV-3- croisements diallèles**

Nous avons réalisé un programme diallèle à partir de cinq génotypes de tournesol d'origines différentes, ayant des caractères agronomiques différents et résistants ou sensible à *Phoma macdonaldii*.

L'homozygotie de ces génotypes a été réalisée et contrôlée par autofécondations successives. Les croisements possibles ont été effectués entre les cinq lignées de manière à obtenir 10 combinaisons F1 d'un diallèle incomplet : ENSAT-B5, ENSAT-R5, AS613, M6-54-1 et B454/03.

Les lignées ainsi que leurs hybrides F1 ont été semés en phytotron dans une expérimentation en blocs randomisés avec trois répétitions (parents et F1) dans des bacs (30 plantes par bac).

L'analyse diallèle est une des méthodes d'étude des caractères quantitatifs. Ces caractères, à hérédité complexe, jouent un rôle prépondérant dans l'amélioration de toutes les espèces végétales. Deux types d'information sont fournis par l'analyse diallèle :

la connaissance de la structure génétique des parents et l'évaluation de leur valeur en croisement, ainsi que l'identification des meilleures combinaisons hybrides. Ces informations sont représentées par les aptitudes générales à la combinaison (AGC) et spécifiques à la combinaison (ASC).

Ces données seront très utiles au sélectionneur pour lui permettre d'établir ses plans de croisements et raisonner sa sélection.

#### *I V-4-Analyse diallèle selon Griffing*

La méthode de Griffing (1956) est basée sur deux modèles :

a- le modèle fixe, appliqué à un nombre limité de lignées fixées pour les espèces autogames et aux lignées inbred des espèces allogames. Les informations obtenues se rapportent seulement aux parents étudiés.

b- le modèle aléatoire, pour lequel les informations peuvent être extrapolées à l'ensemble de la population, à condition que les individus soient la représentation d'une population panmictique en équilibre.

Pour chaque modèle, quatre méthodes peuvent être utilisées selon l'utilisation des parents et le type de croisement.

1- Croisements réciproques et les parents.

2- Un des deux sens de croisements et les parents.

3- Croisements réciproques sans les parents.

4- Un des deux sens des croisements sans les parents.

Dans nos deux expérimentations, nous avons appliqué le modèle et la méthode 2, et le modèle statistique est le suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \lambda_i + \lambda_j + S_{ij} + e_{ij}$$

Avec :

$\mu$  = moyenne de la population

$\lambda(\lambda_j)$  = aptitude générale à la combinaison (AGC) du parent i(j)

$S_{ij}$  = aptitude spécifique à la combinaison du croisement i par j.

$e_{ij}$  = effet de l'environnement sur l'individu ij

L'AGC varie en fonction de l'action additive des gènes. Elle se transmet donc d'une génération à l'autre. L'ASC mesure la déviation de la performance de la F1 par rapport à la moyenne des parents.

L'étude diallèle est basée sur l'analyse de la variance. Quand la variance génotypique est significative, on peut, à partir d'une matrice diallèle construite sur les valeurs moyennes, provenant de l'ensemble des répétitions pour chaque génotype, estimer les variances de l'aptitude générale à la combinaison (AGC) et de l'aptitude spécifique à la combinaison (ASC). Lorsque ces variances sont significatives, il est alors possible d'estimer l'AGC des lignées parentales et ASC des hybrides.

# ***VARIABILITE PHENOTYPIQUE***

## ***DETERMINATION DE LA TOLERANCE DU TOURNESOL A PHOMA MACDONALDII***

### ***Introduction***

*Phoma macdonaldii*, agent pathogène responsable de la maladie des taches noires attaque tous les organes de la plante, les principaux étant le collet, tige et la racine, et ce à tous les stades phénologiques.

La contamination du collet peut entraîner une sénescence prématurée de la plante alors que celle de la tige induit un dessèchement foliaire ayant de fortes conséquences sur le remplissage des graines en huile et en protéines.

De plus, l'existence de souches agressives du champignon et l'absence de génotype de tournesol résistant au *Phoma* incitent les sélectionneurs à prendre en compte cette maladie dans leurs tests d'évaluation variétale.

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une meilleure connaissance de l'agent pathogène, connaissance indispensable pour entreprendre tout programme de sélection. En effet, les tests de sélection, pour qu'ils soient fiables et durables, doivent être basés sur l'utilisation de souches représentatives de la diversité de l'agent pathogène. Pour appréhender cette variabilité, nous avons utilisé des critères de caractérisation phénotypique.

Les souches de *Phoma macdonaldii*, présentent une importante variabilité phénotypique, que ce soit au niveau de la croissance radiale, de la pycnidiogenèse, de l'agressivité, de la morphologie culturale et de la pigmentation (Larfeil, 2003).

Des études précédentes, en conditions contrôlées, ont montré que la résistance du tournesol au phoma était sous la dépendance de plusieurs gènes avec des effets additifs (Roustae et al., 2000a; Rachid Al-Chaarani et al., 2002; Bert et al., 2004). Cependant, le phoma pouvant infecter différents tissus de la plante hôte, les conditions de colonisations sont difficiles à spécifier. Récemment, une spécialisation physiologique du phoma a été décrite (Larfeil, 2003). L'existence d'interaction spécifique entre isolats de *Phoma macdonaldii* et des génotypes de tournesol soulève la question de la stabilité de la résistance dans les cultivars tolérants actuels. La stabilité d'un génotype dépend de la proportion de gènes de résistance spécifiques et non spécifiques. Les gènes de résistance non spécifique ont tendance à être stables vis-à-vis de différents pathogènes, alors que les gènes de résistance spécifiques vis-à-vis



d'un isolat donné entraînent une résistance instable envers les autres isolats du même pathogène. Les méthodes développées par Jenns *et al.* (1982) pour estimer la proportion de gènes de résistance spécifiques et non spécifiques ont été utilisées dans notre étude. Ces méthodes sont dérivées de celles de Eberhart et Russell (1966). Les pentes des droites de régressions indiquent la sensibilité de chaque cultivars à des virulences croissantes (non-spécifiques) et les indices de déviation précisent le niveau des interactions spécifiques entre gène de résistance du végétal hôte et gènes de virulence de l'organisme pathogène. Cette méthode a été utilisée par différents groupes (Faris *et al.*, 1977; Leonard and Moll, 1981; Hamid *et al.*, 1982; Pang and Halloran, 1995).

En infectant différent tissus végétaux (racine, collet et tige) de génotypes actuels de tournesol avec différents isolats de *Phoma macdonaldii*, nos objectifs étaient tout d'abord de définir si les facteurs de résistance était différents suivant les tissus considérés, et ensuite de caractériser les isolats de l'organisme pathogène.

Dans l'étude qui va suivre, nous allons successivement présenter :

- la caractérisation phénotypique des souches sauvages et des souches GFP (croissance sur deux milieux de culture, sporulation et pigmentation).
- La comparaison de l'agressivité entre les souches sauvages et les souches GFP sur collet et racines.
- La spécificité de la tolérance du tournesol à *Phoma macdonaldii* et les interactions entre gènes de résistance et gènes de virulence.

## **VARIABILITE PHENOTYPIQUE**

### **I - Matériel biologique**

#### ***I-1 - Choix des souches de *Phoma macdonaldii****

Nous avons sélectionné 10 souches de *Phoma macdonaldii* : T31A106, T31A72, T31A81, T41A61, T41A63, T41A52, T85B9, T85B15, T85B25, et T79B62 en fonction de

critères de représentativité des zones de culture du tournesol. Les isolats monopycniospores qui en sont dérivés ont été respectivement recodés TA1, TA2..., TA10.

## **I-2 - Souches de *Phoma macdonaldii* exprimant le gène de la GFP.**

Sur les 10 isolats monopycniospores disponibles nous avons choisi deux d'entre eux : TA4 qui est peu agressif et TA6 qui est à l'inverse très agressif. Ces isolats ont été transformés génétiquement afin d'introduire le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein). Suite à la transformation génétique, 18 isolats monopycniospores différents ont été obtenus. Dix isolats sont issus de la transformation de TA4 : TA4-A, TA4-B, TA4-C, TA4-E, TA4-F, TA4-G, TA4-H, TA4-J, TA4-K et TA4-L. Huit isolats sont issus de la transformation de TA6 : TA6-1, TA6-2, TA6-3, TA6-4, TA6-5, TA6-6, TA6-7 et TA6-8.

## ***II - Résultats expérimentaux***

La caractérisation phénotypique a été réalisée à l'aide de 3 critères : la croissance radiale sur milieu V8 et milieu PDA, la sporulation et la pigmentation du champignon. Cette caractérisation phénotypique a été réalisée sur les 10 souches sauvages de *Phoma macdonaldii* et sur les 18 souches transformées génétiquement exprimant la GFP

### **II-1 - Caractérisation phénotypique des souches sauvages et GFP de *Phoma macdonaldii***

#### **II-1-1 - Croissance radiale des souches sauvages**

La croissance radiale des souches sauvages de *Phoma macdonaldii* (en cm) a été mesurée 4, 7 et 10 jours après mise en culture sur milieux PDA ou V8.

Deux analyses de variance ont été réalisées séparément afin de déterminer sur les deux milieux de culture l'effet de l'isolat sur la variabilité de la croissance radiale du champignon.

Les résultats de l'analyse de variance (Tableaux 1 et 2, Annexe 6) montrent que quel que soit le temps de culture, l'effet de l'isolat sur la croissance radiale du champignon sur les milieux PDA et V8 est hautement significatif. Les résultats des mesures effectuées après 10 jours d'expérimentation sont présentés dans les Figure, 1-A et 1-B, et en annexes 6 pour 4 et 7 jours. Sur milieu PDA, la croissance radiale après 4 jours (Fig. 1, Annexe 7) est de 1,7 cm pour l'isolat TA1 et de 5,9 cm pour l'isolat TA7. Après 10 jours de culture (Fig 1-A), la croissance est de 5.3 cm pour TA1 et de 9,6 cm pour TA7. Sur milieu V8 (Fig. 1-B, Annexe 7), après 4 jours d'expérimentation, la croissance radiale est de 1,7 cm pour l'isolat TA1 et 5 cm pour l'isolat TA7. Il est intéressant de remarquer que les souches présentent une grande variabilité de comportement en terme de croissance radiale. Par ailleurs, chaque souche présente le même niveau de croissance que la culture se fasse sur milieu V8 ou PDA. En effet, les souches à croissance lente le sont sur les deux milieux, tout comme les souches à croissance intermédiaire ou les souches à croissance rapide. Les souches TA4 et TA6 qui ont été utilisées pour la transformation avec le gène de la GFP présentent un niveau de croissance intermédiaire.

### **II-1-2- Croissance radiale des souches transformées de *Phoma macdonaldii***

Les résultats de l'analyse de variance présentés dans le (Tableaux 3 et 4, Annexe 6) montrent une différence significative à hautement significative entre les souches.

Les résultats des mesures de croissance présentés dans les Figures 1-C et 1-D montrent que les 18 souches transformées présentent une grande variabilité phénotypique en ce qui concerne leur capacité à se développer sur les 2 milieux de culture testés. Par ailleurs, quel que soit le milieu de culture, certaines souches ont une croissance plus faible que leur souche d'origine tandis que d'autres souches ont des capacités de croissance accrues suite à la transformation subie. La croissance de

l'ensemble des souches est globalement plus faible sur milieu V8 que sur milieu PDA.

Nous pouvons donc en conclure que la transformation pour exprimer la GFP a modifié la croissance radiale des isolats, principalement sur milieu PDA.

### **II-1-3- La sporulation des souches sauvages**

La sporulation a été estimée par dénombrement du nombre de pycnides par mm<sup>2</sup> après 10 jours de culture sur milieu PDA (25°C, héméropériode de 12 h).

Une analyse de variance a été effectuée afin d'estimer l'effet des isolats sur l'efficacité de la sporulation (Tableau 5, Annexe 6). Cet effet est hautement significatif. Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 2-A. TA5 est l'isolat le plus productif, avec 6.9 pycnides/mm<sup>2</sup>. TA7 est en revanche un isolat qui ne produit pas de spores et la croissance radiale est très rapide. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une relation inverse entre la croissance radiale et la production de spores.

### **II-1-4- La sporulation des souches transformées de *Phom macdonaldii***

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 2-B, et l'analyse de variance dans le Tableau 6 (Annexe 6). Alors que la production de pycnides de la souche TA4 était de 6,4 par mm<sup>2</sup>, on peut noter que le nombre de pycnides produites par les souches issues de la transformation par le gène GFP varie entre 0,1 pour TA4-L et 14 pour TA4-E. Un phénomène analogue est observé pour les souches issues de la transformation de TA6, avec un minimum de 0,1 pycnide/mm<sup>2</sup> (TA6-6), un maximum de 6,7 (TA6-4), alors que le résultat obtenu pour TA6 était de 2 pycnides/mm<sup>2</sup>. TA6-6, TA4-L et TA4-A ne produisent presque aucune pycnide. La relation inverse (Fig. 2-B) entre la production de spores et la croissance radiales des souches à la lumière à 25°C est maintenue chez les souches transformées.

### **II-1-5- Pigmentation des souches sauvages de *Phoma macdonaldii***

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 7. Certains isolats présentent une couleur Grey Olivaceous caractéristique de *Phoma macdonaldii* (TA2, TA4). D'autres en revanche, présentent une pigmentation particulière tels TA9, TA8 ou encore TA10.

Tableau (7): Pigmentation (Rayner, 1970) de 10 isolats de *Phoma macdonaldii* déterminée après 10 jours de culture (milieu PDA, 25°C, héméropériode de 12h).

<u>Souches</u>	<u>Pigmentation principale</u>	<u>Souches</u>	<u>Pigmentation principale</u>
TA1	Olivaceous Buff	TA6	Greenish Olivaceous
TA2	Grey Olivaceous	TA7	Olivaceous Buff
TA3	Cuteais	TA8	Saffron
TA4	Grey Olivaceous	TA9	Salmon
TA5	Greenish Olivaceous	TA10	Rosy Buff

#### **II-1-6- Pigmentation des souches de *Phoma macdonaldii* transformées**

Les souches d'origine TA4 et TA6 avaient respectivement une pigmentation de type Grey Olivaceous et Greenish Olivaceous.

Suite à la transformation, les isolats obtenus présentent des modifications par rapport aux 2 souches d'origine. Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau ( 8 ) : Pigmentation (Rayner, 1970) des 18 isolats de *Phoma macdonaldii* transformés avec le gène de la GFP après 10 jours de culture (milieu PDA à pH6, 25°C, héméropériode de 12h)

<u>Souches</u>	<u>Pigmentation principale</u>	<u>Souches</u>	<u>Pigmentation principale</u>
TA6-1	Grey Olivaceous	TA4-A	Greenish Olivaceous
TA6-2	Grey Olivaceous	TA4-B	Flesh
TA6-3	Dark Brick	TA4-C	Scarlet
TA6-4	Peach	TA4-E	Grey Olivaceous
TA6-5	Hazel	TA4-H	Luteous
TA6-6	Hazel	TA4-J	Greenish Olivaceous
TA6-7	Rosy Buff	TA4-G	Greenish Olivaceous
TA6-8	Pale Vinaceous	TA4-F	Pale Vinaceous
		TA4-K	Pale Luteous

## ***II-2- Agressivité des souches de *Phoma macdonaldii****

### ***II-2-1- Agressivité au collet***

#### **II-2-1-1- Agressivité au collet des souches sauvages**

L'agressivité des souches de *Phoma macdonaldii* a été évaluée lors de tests de contamination au collet de plantules de deux lignées de tournesol, C137 et C150, respectivement tolérantes et sensibles à cet agent pathogène (évaluations préalables réalisées lors de l'étude du déterminisme génétique de la tolérance).

L'analyse de variance présentée dans le (Tableau 9, Annexe 6) montre une différence hautement significative entre les deux lignées pour la résistance partielle à *Phoma macdonaldii*, entre les isolats et entre génotypes et isolats. Les résultats présentés dans les Figures 3-A et 3-B, montrent que le développement des symptômes reste faible chez C137 quelle que soit la souche utilisée pour la

contamination. La lignée sensible C150 quant à elle présente des symptômes importants avec les souches TA6 et TA9 (Fig. 3-D). La souche TA6 est celle qui a le niveau d'agressivité le plus élevé. Nous avons donc trouvé une différence entre les lignées (Fig. 3-B). Les quatre isolats présentent une différence d'agressivité : TA2 et TA4 sont peu agressifs, TA6 et TA9 sont très agressifs (Fig. 3-A). Il n'y a pas interaction entre isolats et lignées (Fig. 3-C) Il n'y a pas interaction entre lignées et isolats (Fig. 3-D).

#### **II-2-1-2- Agressivité au collet des souches transformées.**

Les 2 lignées C137 et C150 ont été contaminées au collet pour évaluer l'agressivité des souches GFP.

L'analyse de variance présentée dans le Tableau 10 Annexe 6, montre que les différences entre souches, entre génotypes et enfin entre souches et génotypes sont hautement significatives. Les résultats obtenus (Fig. 4-A et 4-B) montrent une grande variabilité entre les souches transformées pour l'agressivité au collet. Pour les 18 souches testées, les symptômes observés sont toujours plus marqués chez la lignée C150 que chez la lignée C137. On peut cependant noter que la différence entre les 2 lignées est plus ou moins importante selon la souche considérée. Les résultats montrent qu'il n'y a pas interaction entre souches et lignées (Fig. 4-C). Il n'y a pas interaction entre lignées et souches (data not shown).

#### **II-2-2- Agressivité sur racines**

##### **II-2-2-1- Agressivité sur racines des souches sauvages**

L'analyse de variance (Tableau 11, Annexe 6) montre que les différences entre souches, entre génotypes, ainsi qu'entre souches et génotypes sont très significatives.

Les résultats obtenus à partir du test de contamination racinaire, présentés dans la Figure 5, montrent le développement de symptômes quelle que soit la souche

pour la lignée C150 (Fig. 5-B et Fig. 5-D). La souche TA9 est celle qui a le niveau d'agressivité le plus élevé. Il n'y a pas interaction entre isolats et lignées (Fig. 5C). Il n'y a pas interaction entre lignées et isolats (Fig. 5D).

### **II-2-2-2- Agressivité sur racines des souches transformées**

Nous avons contaminé aux racines les 2 lignées C137 et C150 pour évaluer l'agressivité des souches GFP. Pour effectuer cette contamination, il est nécessaire que les souches produisent des pycniospores. Nous avons donc utilisé uniquement les isolats TA4-E, TA4-F, TA4-G, TA4-H, TA4-J, TA4-K, TA6-1, TA6-3, TA6-4, TA6-7, TA6-8.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Les 11 souches présentent une grande variabilité de leur agressivité (Fig. 6-A). Les isolats TA4-F, TA6-1 et TA6-7 présentent une agressivité très faible pour les deux lignées C150 et C137 (Fig. 6-A). L'analyse de variance montre une différence significative entre les isolats et les deux lignées (Tableau 12, Annexe 6). C150 présente un niveau de symptômes très proche de C137, ce qui est étonnant. Cela peut être dû au fait que la précédente notation des lignées sensibles à *Phoma macdonaldii* était basée sur la contamination au collet tandis que l'on contamine ici les racines. Les résultats montrent qu'il n'y a pas interaction entre isolats et lignées (Fig. 6-C). Par contre il y a des interactions entre lignées et isolats (Fig. 6-D).

On peut donc émettre l'hypothèse que si une lignée est résistante au *Phoma* au niveau du collet elle ne l'est pas forcément aux niveaux des racines.

### **Adaptability and virulence specificity in French isolates of *Phoma macdonaldii* on sunflower**

T. Abou Al Fadil, R. Darvishzadeh, M. Alignan, S. Poormohammad Kiani, M.-F. Jardinaud and G. Dechamp-Guillaume\*



Department of Biotechnology and Plant breeding, BAP-ENSAT, 18 Chemin de Borde  
Rouge, BP-107, 31326 Castanet, France

\*Corresponding author

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, avenue de l'Agrobiopole,  
BP 32607, 31326 Auzeville-Tolosane cedex, France

E-mail : dechamp@ensat.fr

Tel: +33 (0)5 62 19 35 83

Fax : +33 (0)5 62 19 35 83

### ***Abstract***

Black stem is considered one of the most serious diseases of sunflower in France, which infect different plant tissues. Our objectives were to (1) investigate whether the *Phoma* resistance factors are different in the root, collar and stem tissue and (2) characterize *Phoma macdonaldii* isolates for using in sunflower disease breeding programmes. Our results showed that there was apparently no strong correlation

between root, collar and stem reactions to *Phoma* under controlled condition, whereas large differences were observed among genotype reactions in each tissue. This suggests the presence of tissue-specific resistance genes for *Phoma macdonaldii*. Furthermore genotype  $\times$  isolate interaction was also significant indicating isolate-specific resistance in sunflower genotypes. The present study demonstrated, even with the small number of isolates used, that *Phoma macdonaldii* is extremely variable in terms of virulence. In this point of view, screening procedures for phoma black stem resistance in controlled conditions should employ a large number of isolates, to ensure that all pathotypes are represented. Screening of sunflower genotypes using an isolate displaying low level of host-specific virulence, e.g. TA3 that has showed low level of host-specific virulence in all three tissues should result in general and presumably more stable resistance to phoma black stem.

**Key words:** Sunflower, *phoma macdonaldii*, root, collar, stability

## Introduction

There are 2000 descriptions of phoma species mainly as saprophyte or facultative parasites of plants (Sutton, 1980). The mitotic sporulating fungus *Phoma macdonaldii* (McDonald, 1964), the causal agent of black stem of sunflower (*Heliantus annuus* L.), has been reported from many European countries (Yugoslavia, Italy, Bulgaria, Romania) (Maric *et al.*, 1988), Asia (Iran, Pakistan, China,) (Siddique-Mizaet *et al.*, 1988), United states (Acimovic, 1984) and Australia (Asimovic, 1984). Black stem is

considered one of the most serious diseases of sunflower in France. The disease has been spreading steadily since 1990, and the fungus is now a major component of the pathogenic complex on sunflower (Peres and Lefol, 1996). It causes premature ripening resulting in yield losses of 10 to 30% (Penaud, 1996), decreased oil content (Maric *et al.*, 1988), and decreased thousand seed weight (Carson, 1991). Stunted plants with thin stems, smaller heads, lighter and fewer seeds per head, blackened pith and frequently premature death (Donald *et al.*, 1987) have been also observed. *Phoma* can infect different organs of sunflower. Generally, *Phoma macdonaldii* infects the lower leaves of sunflower, through spores spreaded by wind or rain or by leaf-feeding insects (Maric and Schneider, 1979; Penaud, 1994). The most notable symptom of infection is the formation of black spots on the stem, around the petiole insertion point. At the base of stems coalescing spots develop into a wide black sleeve (Pérès and Lefol 1996). Lesions have also been reported to occur on the plant head and leaves (Mc Donald *et al.*, 1964). *Phoma* may also infect root system of seedlings, resulting in a girdling lesion occurring at the soil level. *Phoma macdonaldii* infects the plants through direct penetration via enzyme and toxin effects or mechanical pressure or indirectly through wounds or plant structural openings such as lenticels or stomata. (Isaac, 1992; Roustaei *et al.*, 2000). The different tissues of the host (cotyledon petiole, leaf petiole, leaf lamina, stem, etc.) may be penetrated differently by the same fungus (Isaac, 1992).

In breeding for resistance to Sclerotinia and Phomopsis, independent resistance in the leaf and stem has been observed (Castano *et al.*, 1993 and Degener *et al.*, 1999). There is an increasing interest in sunflower breeding programs and in the development of cultivars, with improved resistance to *Phoma macdonaldii*. To date, sunflower genotypes with different levels of partial resistance to this disease have been identified, but no fully resistant genotypes are available. Previous studies in controlled conditions showed that resistance to phoma black stem in sunflower is conferred by more than one gene with additive gene effects (Roustaei *et al.*, 2000 a; Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Bert *et al.*, 2004). Furthermore, *Phoma* can infect

different plant tissues, which makes it difficult to control. Recently, physiological specialization of phoma isolates has been reported (Larfeil, 2003). The existence of specific interaction between isolates of phoma black stem and sunflower genotypes raises the question of stability of resistance in current phoma black stem resistant cultivars. Stability of a genotype depends on the proportion of specific and non-specific resistant genes in plants. Non-specific resistance genes tend to be stable against different pathogen isolates; whereas specific resistant genes for a given isolate causes a non-stable resistance against other isolates of the same pathogen. Methods developed by Jenns *et al.* (1982) to estimate the proportion of specific and non-specific resistance genes in a model system are used in the present study to estimate the proportion of specific and non-specific virulent genes in *Phoma macdonaldii*. These methods are extension of those of Eberhart and Russell (1966). The slopes of the regressions indicate the sensitivity of each cultivar to increased general (non-specific) virulence and the deviation from regression indicate the level of specific interaction between the genes for resistance in the cultivar and those for virulence in the isolates of the pathogen. Adapting Eberhart and Russell (1966) method for studying stability of host cultivar disease resistance was used by several authors (Faris *et al.*, 1977; Leonard and Moll, 1981; Hamid *et al.*, 1982; Pang and Halloran, 1995).

By infecting different tissues (root, collar and stem) of current sunflower genotypes with different *Phoma macdonaldii* isolates, our objectives were to (1) investigate whether the Phoma resistance factors are different in the root, collar and stem tissue and (2) characterize *Phoma macdonaldii* isolates for using in sunflower disease breeding programmes.

## **Materials and methods**

### **Plant materials**

Experiments were carried out with 4 varieties of sunflower, Melody (Syngenta seeds SAS), DK3825 (RAGT Semences), Heliasol (Semences de France) and Prodisol (Monsanto/Dekalb).

## **Fungal isolates**

Naturally infected plants from center, South-west and West of France showing characteristic symptoms of black stem, were collected and cut into pieces (5x5 mm), surface-sterilized for 5 minutes in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees), washed three times (5 min) in sterile distilled water, and transferred to Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA, 39 g/l, pH 6) to obtain pycniospores, or V8 (V8 200 ml/l, Agar 20 g/l, pH 6; Campbell Grocery Products Ltd) for mycelium growth. For pycniospore production, Petri dishes were incubated under alternating periods of illumination (12 h,  $37 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ; Philips TLD 15W33 lamps) and darkness to induce sporulation. To allow mycelia growth, Petri dishes were incubated for 10 days at 25°C in the dark. Ten monopycniospore isolates (TA1, TA2,...,TA10) were prepared by serial dilutions (Barrault 1989) and maintained on PDA for further subculture or on V8 for mycelium growth. Pycniospore suspensions were obtained by placing one cm<sup>2</sup> from these cultures in a Petri dish containing 10 ml sterile distilled water.

## **Conservation of isolates**

It is essential that the pathological and physiological characteristics of isolates remain constant during storage. The method described by Barrault (1989), which proved adequate for the conservation of *Pyrenophora teres*, was adapted for *Phoma macdonaldii*. A sunflower stem fragment, sterilized at 120°C for 20 min, was placed on a culture of a monospore isolate on PDA. Pycnidia were visible on the stem fragment after incubation for 15 days at 25±1°C under a 12-h cycle of illumination ( $37 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) and darkness. When these fructifications were well developed, the stem fragment was placed in a sterile hemolysis tube containing CaCl<sub>2</sub> crystals (as a desiccant) at the bottom. Tubes were closed with an absorbent cotton plug, covered with an aluminum foil and kept in the dark at 6°C. This method, used since 1996, has proved to be efficient for long-term storage of *Phoma macdonaldii* isolates (data not published).

## **Experimental design and growth condition**

Three separate experiments were conducted in controlled conditions based on the completely randomized split plot design with three replications. Each replicate consisted of 15 plants. In each experiment, one of the three tissues (root, collar or stem) was inoculated. For stem and collar contaminations, seeds were sterilized for 5 min in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees) and washed in sterile distilled water. Three rows of five seeds per genotype per replication were sown in plastic containers (40x30x30 cm). Seedlings were irrigated with water. The experiment was conducted in a controlled growth chamber (25/21± 1°C day/night and a relative humidity of 75-80%). Light intensity was 200  $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with a 14 h photoperiod (NAV-T 600W lamps Osram-Vialox, Molsheim, France).

In order to contaminate roots, plants were sown in Magenta boxes (one plant per box) containing Murashige and Skoog medium (Duchefa) (4.4 g/l), in Phytigel (2.8 g/l; Sigma). Experiment was performed in growth chamber (26/19 ± 1°C day/night, 75-80% relative humidity, 14h photoperiod at 200 $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  provided by NAV-T 600W lamps Osram-Vialox, Molsheim, France).

## **Stem infection**

Twelve-day-old seedlings were inoculated at the junction of the cotyledon petiole and hypocotyl with 20  $\mu\text{L}$  of a pycniospore suspension ( $10^6$  pycniospores per ml of water containing 0.25% gelatin) using a micropipette. After inoculation, each container was enclosed for 48 h using a transparent cover to maintain a near-saturated humidity favorable for fungal infection. Small chlorotic lesions appeared on the surface of the cotyledon petiole 1-2 day after inoculation. Seven days after inoculation both cotyledon petioles of the seedling were scored according to the percentage of the petiole area exhibiting disease symptoms (necrosis). A rating scale from 1 to 9, based on the percentage of infected cotyledon petiole area, was used, where 1 = 0-5%, 2 = 6-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-30%, 5 = 31-40%, 6 = 41- 60%, 7 = 61-80%,

8 = 81-99% and 9 = 100% with necrosis spreading down the stem (Roustaei *et al.*, 2000).

### **Collar infection**

A disc of V8 agar with mycelium (6 mm diameter) was used for contamination of each twelve-day-old seedling collars. After contamination, the plastic containers were enclosed for 48 h using special transparent cover (plexiglass) to maintain a near-saturated humidity favorable for fungal inoculation. The size of necrosis was measured after 10 days. A 6 mm diameter disc of V8 medium-cultured isolates was placed on seedling collar as controls. The development of lesions on the collar was evaluated on a 1-9 scale for the percentage of necrotic area 7 days after contamination, where 1 = 0-5%, 2 = 6-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-30%, 5 = 31-40%, 6 = 41-60%, 7 = 61-80%, 8 = 81-99% and 9 = 100%, with necrosis spreading up the collar.

### **Root infection**

Twelve-day-old seedlings were infected by 20 µl of a pycniospore suspension ( $10^6$  pycniospores per ml of water containing 0.25% gelatin) added to the medium using a syringe. Seven days after contamination, the development of symptom was scored from 1 to 9 where 1 = 0-0.5cm, 2 = 0.5-1cm, 3 = 1-1.6cm, 4 = 1.6-2.2cm, 5 = 2.2-2.8cm, 6 = 2.8-3.4cm, 7 = 3.4-4cm, 8 = 4 -4.6cm, 9 = 4.6-6 cm necrosis area on the root.

### **Data Analysis**

Individual and joint analyses of variance were performed using the general linear model (GLM) procedure in the SAS software (SAS Institute, Cary, NC). The purpose of the joint analysis was to identify the effect of genotype, isolate and also different parts of plant (tissue) as well as their interactions. Normal distribution of frequency of the disease severity score was performed by the Sharpino-wilks W-statistic test, using the program univar of SAS software. To characterize isolates stability the following linear regression model was used (Eberhart and Russell, 1966).

$$Y_{ij} = \mu + b_i I_j + \delta_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Where,  $Y_{ij}$  is the mean for the isolate  $i$  on the genotype  $j$ ;  $\mu$  is the general mean for isolate  $i$  over all genotypes,  $b_i$  is the regression coefficient that measure the response of the  $i$ th isolate to varying level of the phoma black stem resistance in the genotypes;  $I_j$  is the resistance index, which is defined as the mean deviation for all isolates at a given genotype from the overall mean;  $\delta_{ij}$  is the deviation from regression of the  $i$ th isolate on the  $j$ th genotype; and  $\epsilon_{ij}$  is the mean for experimental error. Two stability parameters were calculated based on (a) the regression coefficient that is estimated as fallows (Sing and Chaudhary, 1979).

$$b_i = \frac{\sum_j Y_{ij} I_j}{\sum_j I_j^2}$$

Where  $\sum_j Y_{ij} I_j$  is the sum of products and  $\sum_j I_j^2$  is the sum of squares.

(b) Mean square deviation, ( $S_{di}^2$ ) from linear regression, which is estimated as fallow;

$$S_{di}^2 = \left[ \frac{\sum_j \delta_{ij}^2}{S-2} \right] - \delta_e^2$$

Where  $\sum_j \delta_{ij}^2 = \left[ \sum_j Y_{ij}^2 - \frac{Y_i^2}{t} \right] - \frac{(\sum_j Y_{ij} I_j)^2}{\sum_j I_j^2}$  and  $\delta_e^2 = \frac{MS_{Error}}{r}$

The significance of the regression coefficients was determined using the 't' student test.

## Results

### *Response to artificial infection*

The 10 monopycniospore isolates investigated in this study showed high variability relative to spore production. The range of the number of spore produced by isolates was from 0 pycnide/mm<sup>2</sup> for isolate TA7 to 6.9 pycnides/mm<sup>2</sup> for TA5 isolate (data



not shown). TA7 isolate was not used for stem and root contamination as it did not produced pycniospore. The individual analysis of variance for disease severity score indicated differences ( $P < 0.001$ ) among genotypes, isolates as well as genotype\*isolates interaction (Table 1). The isolate mean in root contamination ranged from 3.35 (TA1) to 7.20 (TA6) (Table 1). Generally highly or weakly virulent isolates were not associated with particular geographical sites. However, all isolates originating from center of France were almost more virulent than those originating from other sites. This random distribution of isolates related to their origin was also apparent from the mean values for collar and stem contaminations (Table 2 and 3). In collar contamination means ranged from 0.4 (TA7) to 7.68 (TA3) and in stem contamination from 2.80 (TA1) to 8.74 (TA6). TA1 and TA6 showed to be the least and the most virulent isolates for both stem and root contamination. However the degree of virulence for other isolates depended on the genotype or the tissue infected by isolates.

Homogeneity of variance was observed for mean square of the residues for each tissue contaminated, which allowed the joint analysis of variance (data not shown). In joint analysis of variance we used nine isolates that were commonly used for contamination of all three tissues. The results of joint analysis are summarized in table 4. High significant difference observed among tissue, genotype and isolates. The interactions for all tested binary combinations as well as for the triple combination (genotype  $\times$  isolate  $\times$  tissue) were significant (Table 4). Pairwise regression analysis between mean disease severity scores for different tissues of genotype-isolates combination also indicated a general poor relationship between them (Fig.1). The best relationship was observed between mean disease severity score at the stem and collar contamination ( $R^2 = 0.39$ ) followed by stem  $\times$  root contamination ( $R^2 = 0.12$ ) and collar  $\times$  root contamination ( $R^2 = 0.06$ ).

#### ***Estimation of the proportion of genes for specific and non-specific virulence***

The results of combined analysis of variance are presented in Table 5. The mean square for genotype (linear) was highly significant in root and collar contamination,

but it was not so for stem contamination. The genotype x isolate (linear) mean square was significantly greater than their respective pooled deviation mean square in collar contamination indicating that the regression coefficients were significantly different. In other cases it was not significant. Deviation mean squares for individual isolates in root contamination, tested against pooled error, showed that all of them displayed significant levels of specific virulence (Table 5). In two other cases, stem and collar contamination, 5 and 7 isolates showed significant mean square respectively. In this context, it seems that deviation from regression was an important indicator of the proportion of genes for specific and non-specific virulence. For completeness, however, the regression coefficient derived from individual regression of sets of isolate means against host resistance index as well as deviation mean square for all three tissues were separately plotted against isolate mean (over all genotypes) (Fig 2 and 3). An isolate is considered stable when it shows a regression coefficient near zero and small deviation from regression. Stability in this context refers to the ability of a particular isolate to perform consistently, with respect to virulence, over a wide range of host genotypes. Highly stable isolates, therefore, are not likely to contribute much to observed genotype-isolate interactions. Considering these criteria, in collar contamination, the isolates TA5, TA7 and TA9 were highly stable whereas in stem and root contamination no stable isolates were observed.

## **Discussion**

### ***Response to the different *Phoma* isolates***

Depending on the presence or absence of interaction between host genotypes and pathogen isolates, the terms vertical resistance in the host and virulence in the pathogen vs. horizontal resistance in the host and aggressiveness in the pathogen are used (Vanderplank 1978). We addressed this for *Phoma* by infecting four sunflower

genotypes with nine different *Phoma* isolates originating from different region of France. In individual analysis of variance based on the balanced completely randomized split plot design for each of three tissues, we showed significant interaction between isolates and sunflower genotypes suggesting that the resistance to *Phoma macdonaldii* can also be isolate-specific in sunflower and the term virulence can be used for *Phoma* isolates (Table 1, 2 and 3). Similarly the significant genotype-isolate interaction indicates a vertical resistance of sunflower genotypes to phoma. Larfeil *et al.* (2002) found that sunflower showed different levels of resistance to *Phoma* black stem isolates from France and other countries. The detection of difference among isolates is not surprising when large number of isolates collected is compared. The probability of detecting one isolate that differs from the others increases with the number of isolates tested, and this is more likely to happen with isolates from location distant from one another. Having high range of significant difference in spite of small sample of isolates, suggest that *Phoma macdonaldii* forms different isolates with different aggressiveness.

Environmental factors such as light and temperature could alter expression of resistance, however, such factors could not influence our results because the experiments with nine isolates were conducted under controlled environmental condition. In other part, our previous finding with both traditional and molecular methods showed that the resistance to *Phoma* is polygenic and controlled quantitatively. Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002) by using recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross between PAC-2 and RHA-266 and Bert *et al.* (2004) by using F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub> families derived from a cross between PAZ2 and FU found seven and four QTLs controlling resistance to *Phoma* respectively. It is noteworthy that in all previous studies only an isolate MP6 has been used. In this context, as with other disease, for example *Septoria tritici* blotch in wheat (Chartrain 2004; Chartrain *et al.*, 2004a and b) it looks that both major and minor genes controlled resistance to *Phoma* in sunflower.

Our results showed that there was apparently no strong correlation between root, collar and stem reactions to *Phoma* under controlled condition, whereas large differences were observed among genotype reactions in each tissue. This suggests the presence of tissue-specific resistance genes for *Phoma* as it has been also reported in sunflower *Sclerotinia* (Castano *et al.*, 1993) and *Phomopsis* (Degener *et al.*, 1999) pathosystems. They reported that resistance to *Sclerotinia* and *Phomopsis*, are independent in the leaf and stem. In the present study our results showed that resistance of sunflower to *Phoma* black stem depend on (i) the isolates infecting and (ii) the tissue infected by pathogen. Bert *et al.*, (2004) also in their recently published paper concluded that breeding sunflowers for resistance to *S. sclerotiorum* and *P. macdonaldii* is complicated by the fact that the two pathogens can attack several parts of the plant and the level of resistance may be different for each plant part. In this context two hypotheses could be considered. Either different resistance mechanisms are involved in different tissues, thus, better resistance could be obtained by combining resistance of different tissues. Another hypothesis, however, postulates that within a natural pathogen population there is progressive selection of isolates that are more aggressive on specific plant parts. This may also indicate a modulation of the aggressiveness of the pathogen population according to plant parts, resulting from the effects of environment factors on disease expression. Thus separating isolates from stem, collar and root when sample are collected are suggested.

### **Stability analysis**

The combined analysis of variance (Table 5) indicated that most of the virulence variation due to genotype-isolate interaction could be accounted for by both linear regression of the isolate means against the resistance index and non-linear response to it. This is in agreement with the work of Hamid *et al.* (1982) in *Zea mays* L./ *Cochliobolus carbonum* pathosystem that indicated stability of resistance/virulence could be adequately described by these parameters. In the stability analysis of crop yield by Finlay and Wilkinson (1963) and Eberhart and Russell (1966), high stability

( $0.0 \leq b_i \leq 1.0$ ) was generally regarded as undesirable, as crop cultivars that are environmentally intensive may not respond advantageously to favorable environmental conditions. With respect to pathogen virulence, high stability may be undesirable for adaptiveness as highly stable pathogen do not respond to susceptible hosts as much as the less stable pathogen. The present study demonstrated, even with the small number of isolates used, that *Phoma macdonaldii* is extremely variable in terms of virulence. In view of this, screening procedures for phoma black stem resistance in controlled conditions should employ a large number of isolates, to ensure that all pathotypes are represented. This is often not practical, and many current inoculation procedures in controlled condition rely on the use of pycnidiospore inoculums derived from a small number of isolates. In such cases, isolates possessing high level of specific virulence, e.g. TA5 should not be used to screen breeding lines for black stem resistance, as they may cause the selection for isolate-specific, rather than non-specific resistance. Screening of sunflower genotypes using an isolate displaying low level of host-specific virulence, e.g. TA3 that has showed low level of host-specific virulence in all three tissues should result in general and presumably more stable resistance to phoma black stem.

## ***References***

- Acimovic, M.**, 1984 Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia, 1981-1983. *Helia* 7:45-54.
- Barrault G** (1989) L'helminthosporiose de l'orge causée par *Drechslera teres*. Toulouse, France: Institut National Polytechnique, PhD Thesis.
- Bert P-F, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F** (2004) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3.Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theor Appl Genet* 109: 865-874.

- Chartrain L** (2004) Genes for isolate-specific and partial resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. Norwich, UK. John Innes Centre, University of East Anglia, PhD Thesis.
- Chartrain L, Brading PA, Makepeace JC, Brown JKM** (2004a) Sources of resistance to *Septoria tritici* blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathol* **53**:454–460.
- Chartrain L, Brading PA, Widdowson JP, Brown JKM** (2004b) Partial resistance to *Septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the wheat cultivars Arina and Riband. *Phytopathology* **94**:497–504.
- Carson, M.L.**, 1991. Relationship between Phoma Black Stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant disease*. **75**: 1150-1153.
- Castañó F, Vear F, Tourvieille D** (1993) Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relation with some morphological characters. *Euphytica* **68**: 85-98.
- Degener J, Melchinger AE, Hahn V** (1999) Resistance in the leaf and stem of sunflower after infection with two isolates of Phomopsis. *Plant Breeding* **118**:405-410.
- Donald, P.A., Venette, J.R., and Gulya, T.J.**, (1987) Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Dis.***71**: 466-468.
- Eberhart SA, Russell WA** (1966) Stability parameters for comparing varieties. *Crop Sci.* **6**: 36-40.
- Faris MA, Lira M de A, Leao Veiga AF de S** (1979) Stability of sorghum midge resistance. *Crop Sci.* **19**: 577-580.
- Finlay KW, Wilkinson GN** (1963) The analysis of adaptation in a plant breeding programme. *Aust. J. Agric. Res.* **14**: 742-754.
- Hamid AH, Ayers JE, Hill RRJr** (1982) Hostx isolate interactions in corn inbreds inoculated with *Cochliobolus carbonum* race 3. *Phytopathology* **72**: 1169-1173.
- Isaac, S.**, 1992. Fungal-Plant Interactions. Chapman & Hall, London.
- Jenns AE, Leonard KJ, Moll RH** (1982) Stability analysis for estimating relative durability of quantitative resistance. *Theor Appl Genet* **63**: 183-192.

- Larfeil C, Dechamp-Guillaume G, Barrault G** (2002) *Phoma macdonaldii* Boerema/*Helianthus annuus* L. interaction. *Helia* **36**: 153-160.
- Larfeil C** (2003) La maladie des taches noires du tournesol causée par *Poma macdonaldii* Boerema: Variabilité phénotypique et moléculaire – Evaluation de la sensibilité génotypes à la maladie – Modalités de l’infection. Thèse de doctorat de l’Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Leonard KJ, Moll RH** (1981) Durability of general resistance: evaluation of cultivar x isolate interaction. Proc. Symposia, IX Inter. Congr. Plant Protection, Washington, DC, USA, August 5-11, 1979. Vol. I, pp. **190-193**.
- MacDonald WC** (1964) *Phoma* Black Stem of Sunflower. *Phytopathology* **54**: 492-493.
- Maric A, Camprag D, Masirevic S** (1988). Bolesti i stetocine suncokreta. In: Injivo suzbijanje Nolit, Beograd pp. **37-45**.
- Maric A, Schneider R** (1979) Die schwartzfleckenkrankheit der sonnenblume in jugoslawien und der erregger *Phoma macdonaldii* Boerema. *Phytopathologische Zeitschrift* **94**: 226-233.
- Pang KEC, Halloran GM** (1995) Adaptability and virulence specificity in Australian strains of blackleg [*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et De Not.] on different host genotypes of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Aust. J. Agric. Res.* **46**: 971-984.
- Penaud, A.**, 1996. *Phoma* du tournesol: Recherche des époques de contamination et mise au point de la protection fongicide. Pages 694-699 in: Proc. 14th Internat. Sunflower Conference. Organizing Committee of the 14th International Sunflower Conference, Beijing, China.
- Penaud, A., Pérès, A.**, 1994. *Phoma* du tournesol. *Oléoscope* **15**, **37**.
- Penaud A** (1994) *Phoma* du tournesol : la lutte s’organise. *Phytoma* **460**: 38-40.
- Pérès, A., and Lefol, C.**, 1996. *Phoma macdonaldii* Boerema: Eléments de biologie et mise au point d’une méthode de contamination artificielle en conditions contrôlées. Pages **687-693** in: Proc. of the 14th Internat Sunflower Conference. Beijing, China.
- Rachid Al-Chaarani G, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A** (2002) A QTL analysis of sunflower partial

resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). Theor Appl Genet **104**:490–496.

**Roustae A, Costes D, Dechamp-Guillaume G, Barrault G** (2000a) Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. Plant Pathol **49**:227–234.

**Roustae A, Barrault G, Dechamps-Guillaume G, Lesigne P, Sarrafi A** (2000b) Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. Plant Pathol **49**:396–401.

**SAS Inst** (2001) Statistical analysis system online documentation. Cary, NC.

**Sing RK, Chaudhary BD** (1979) Biometrical methods in quantitative genetic analysis. Kalayni Publishers, New Delhi, **304** p.

**Siddique-Mirza, M., Masood, A. R., and Ayub, M.,** 1988. Sunflower diseases in Pakistan in the period 1980 to 1987. Pages 2-25 in: Proc. 12th Inter. Sunflower Conf. Tissueizing Committee of the International Sunflower Conference, Novi-Sad, Yugoslavia

**Smolik, J. D., Walgenbach, D. D., and Carson, M. L.,** 1983. Initial evaluations of early dying of sunflower in South Dakota. Pages 24-25 in: Proc. Sunflower Res. Workshop, Fargo.

**Sutton BC** (1980) The coelomysetes. Commonwealth Mycological Institute: Kew, England.

**Vanderplank JE** (1978) Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. Springer Verlag, Berlin, New York.



Table 1. Mean disease score on root of 4 sunflower genotypes caused by 10 isolates of *Phoma macdonaldii* seven days after inoculation

Isolate	Genotype				$\bar{X}$ Isolate <sup>1</sup>
	DK3825	Heliasol	Melody	Prodisol	
TA1	<sup>3</sup> 2.33 <sup>n</sup> ±0.31	5.93 <sup>gh</sup> ±0.12	1.27 <sup>o</sup> ±0.12	3.87 <sup>l</sup> ±0.42	3.35 <sup>g</sup> ±1.85
TA2	4.60 <sup>jk</sup> ±0.53	8.07 <sup>bc</sup> ±0.31	3.53 <sup>l</sup> ±0.42	5.73 <sup>ghi</sup> ±0.31	5.48 <sup>c</sup> ±1.79
TA3	7.13 <sup>de</sup> ±0.23	8.53 <sup>ab</sup> ±0.42	5.00 <sup>ijk</sup> ±0.00	6.27 <sup>fg</sup> ±0.46	6.73 <sup>b</sup> ±1.37
TA4	5.87 <sup>ghi</sup> ±0.46	6.73 <sup>ef</sup> ±0.70	2.27 <sup>n</sup> ±0.31	5.40 <sup>ghij</sup> ±0.53	5.07 <sup>d</sup> ±1.82
TA5	3.60 <sup>l</sup> ±0.40	6.00 <sup>gh</sup> ±0.40	3.40 <sup>lm</sup> ±0.20	5.40 <sup>ghij</sup> ±0.35	4.6 <sup>e</sup> ±1.21
TA6	5.13 <sup>hijk</sup> ±0.12	8.73 <sup>ab</sup> ±0.23	7.73 <sup>cd</sup> ±0.64	7.20 <sup>de</sup> ±0.40	7.20 <sup>a</sup> ±1.41
TA8	3.27 <sup>lm</sup> ±0.61	8.93 <sup>a</sup> ±0.12	4.47 <sup>k</sup> ±0.42	3.60 <sup>l</sup> ±0.20	5.07 <sup>d</sup> ±2.40
TA9	2.93 <sup>lmn</sup> ±0.12	5.67 <sup>ghi</sup> ±0.12	3.07 <sup>lmn</sup> ±0.12	3.00 <sup>lmn</sup> ±0.00	3.67 <sup>f</sup> ±1.21
TA10	2.27 <sup>n</sup> ±0.23	5.33 <sup>hij</sup> ±0.31	3.27 <sup>lm</sup> ±0.12	2.60 <sup>mn</sup> ±0.53	3.37 <sup>g</sup> ±1.28
$\bar{X}$ Genotype <sup>2</sup>	4.13 <sup>c</sup> ±1.64	7.10 <sup>a</sup> ±1.43	3.78 <sup>d</sup> ±1.79	4.79 <sup>b</sup> ±1.55	

<sup>1</sup> Main effect of isolate

<sup>2</sup> Main effect of genotype

<sup>3</sup> Genotype-isolate interactions

\*Isolates or genotypes with different letters are significantly different

Table 2. Mean disease score on collar of 4 sunflower genotypes caused by 10 isolates of *Phoma macdonaldii* 7 days after inoculation

Isolate	Genotype				$\bar{X}$ Isolate <sup>1</sup>
	DK3825	Heliasol	Melody	Prodisol	
TA1	<sup>3</sup> 1.10 <sup>pq</sup> ±0.09	2.05 <sup>mno</sup> ±0.05	0.38 <sup>r</sup> ±0.25	1.50 <sup>op</sup> ±0.26	1.26 <sup>g</sup> ±0.65
TA2	2.83 <sup>kl</sup> ±0.08	7.02 <sup>ef</sup> ±0.21	2.72 <sup>klm</sup> ±0.25	8.32 <sup>b</sup> ±0.16	5.22 <sup>c</sup> ±2.60
TA3	7.70 <sup>cd</sup> ±0.09	8.05 <sup>bc</sup> ±0.15	6.03 <sup>g</sup> ±0.32	8.95 <sup>a</sup> ±0.10	7.68 <sup>a</sup> ±1.11
TA4	3.67 <sup>i</sup> ±0.48	2.45 <sup>klmn</sup> ±0.38	0.52 <sup>r</sup> ±0.28	3.95 <sup>i</sup> ±0.23	2.65 <sup>e</sup> ±1.44
TA5	2.08 <sup>mno</sup> ±0.29	2.10 <sup>lmno</sup> ±0.61	1.47 <sup>op</sup> ±0.25	2.25 <sup>lmn</sup> ±0.25	1.98 <sup>f</sup> ±0.45
TA6	6.65 <sup>f</sup> ±0.44	8.28 <sup>b</sup> ±0.30	6.68 <sup>f</sup> ±0.40	8.83 <sup>a</sup> ±0.14	7.61 <sup>a</sup> ±1.05
TA7	0.37 <sup>r</sup> ±0.23	0.37 <sup>r</sup> ±0.23	0.35 <sup>r</sup> ±0.26	0.53 <sup>r</sup> ±0.42	0.40 <sup>h</sup> ±0.26
TA8	5.08 <sup>h</sup> ±0.13	7.52 <sup>cde</sup> ±0.26	3.15 <sup>j</sup> ±0.25	7.33 <sup>de</sup> ±0.15	5.77 <sup>b</sup> ±1.88
TA9	3.10 <sup>jk</sup> ±0.05	2.65 <sup>ijklm</sup> ±0.13	1.80 <sup>no</sup> ±0.09	4.03 <sup>i</sup> ±0.57	2.90 <sup>d</sup> ±0.88
TA10	2.40 <sup>klmn</sup> ±0.28	2.73 <sup>ijklm</sup> ±0.13	0.82 <sup>qr</sup> ±0.30	4.08 <sup>i</sup> ±0.33	2.51 <sup>e</sup> ±1.24
$\bar{X}$ Genotype <sup>2</sup>	3.49 <sup>c</sup> ±2.17	4.32 <sup>b</sup> ±2.92	2.39 <sup>d</sup> ±2.23	4.98 <sup>a</sup> ±3.05	

<sup>1</sup> Main effect of isolate

<sup>2</sup> Main effect of genotype

<sup>3</sup> Genotype-isolate interactions

\*Isolates or genotypes with different letters are significantly different

Table 3. Mean disease score on stem of 4 sunflower genotypes caused by 10 isolates of *Phoma macdonaldii* 7 days after inoculation

Isolate	Genotype				$\bar{X}$ Isolate <sup>1</sup>
	DK3825	Heliasol	Melody	Prodisol	
TA1	<sup>3</sup> 6.23 <sup>abc</sup> ±2.40	1.40 <sup>c</sup> ±0.40	1.20 <sup>a</sup> ±0.20	2.35 <sup>a</sup> ±0.65	2.80 <sup>d</sup> ±2.38
TA2	9.00 <sup>a</sup> ±0.00	8.85 <sup>a</sup> ±0.15	7.30 <sup>abc</sup> ±0.20	8.70 <sup>a</sup> ±0.00	8.46 <sup>a</sup> ±0.72
TA3	8.75 <sup>a</sup> ±0.25	8.40 <sup>ab</sup> ±0.40	6.80 <sup>abc</sup> ±1.20	8.60 <sup>a</sup> ±0.40	8.14 <sup>a</sup> ±1.00
TA4	5.55 <sup>abcd</sup> ±3.05	7.80 <sup>abc</sup> ±0.70	8.10 <sup>abc</sup> ±0.90	6.60 <sup>abc</sup> ±1.60	7.01 <sup>b</sup> ±1.87
TA5	8.50 <sup>ab</sup> ±0.50	5.75 <sup>abcd</sup> ±2.25	5.00 <sup>cd</sup> ±2.50	6.30 <sup>abc</sup> ±2.00	6.39 <sup>b</sup> ±2.16
TA6	9.00 <sup>a</sup> ±0.00	8.85 <sup>a</sup> ±0.15	8.40 <sup>ab</sup> ±0.60	8.70 <sup>a</sup> ±0.30	8.74 <sup>a</sup> ±0.37
TA8	8.20 <sup>abc</sup> ±0.80	8.90 <sup>a</sup> ±0.10	8.45 <sup>ab</sup> ±0.45	8.70 <sup>a</sup> ±0.30	8.56 <sup>a</sup> ±0.50
TA9	3.30 <sup>de</sup> ±0.10	7.65 <sup>abc</sup> ±0.55	7.80 <sup>abc</sup> ±0.20	8.20 <sup>abc</sup> ±0.80	6.74 <sup>b</sup> ±2.19
TA10	2.30 <sup>e</sup> ±0.30	5.25 <sup>bcd</sup> ±0.85	2.40 <sup>e</sup> ±0.40	6.70 <sup>abc</sup> ±1.10	4.16 <sup>c</sup> ±2.07
$\bar{X}_{\text{Genotype}}$ <sup>2</sup>	6.76 <sup>a</sup> ±2.71	6.98 <sup>a</sup> ±2.50	6.16 <sup>b</sup> ±2.75	7.21 <sup>a</sup> ±2.17	

<sup>1</sup> Main effect of isolate

<sup>2</sup> Main effect of genotype

<sup>3</sup> Genotype-isolate interactions

\*Isolates or genotypes with different letters are significantly different

Table 4. Joint analysis of variance for disease severity in sunflower genotypes infected by 9 isolates of *Phoma macdonaldii* at three following tissues: root, collar and stem

Source of variation	d.f.	MS	F
Total	323	7.10	
Model	131	16.84	37.20***
Replication	2	0.544	0.31ns
Tissue	2	192.94	109.02***
Replication x Tissue (Ea)	4	1.77	3.91**
Genotype	3	71.02	222.19***
Genotype x Tissue	6	17.96	39.67***
Replication x Genotype x Tissue (Eb)	18	0.32	0.071
Isolate	8	124.52	275.06***
Isolate x Tissue	16	11.145	24.62***
Isolate x Genotype	24	4.05	8.95***
Isolate x Genotype x Tissue	48	4.451	9.83***
Residual (Ec)	192	0.453	
Coefficient of determination (R <sup>2</sup> )	0.96		
Coefficient of Variation (C.V.)	12.70		

d.f.= degrees of freedom

MS= Mean of square

\*\*\* and \*\*significant at 0.001 and 0.01 probability level respectively; n.s.= non significant

Table 5. Combined analysis of variance, individual-isolate deviation MS and regression coefficients for the virulence (based on root, collar and stem contamination) of 10 isolates of *Phoma macdonaldii* each on four sunflower genotypes

Source of Variation	d.f.	Root Contamination			Stem Contamination			d.f.	Collar Contamination		
		MS	F	b <sub>i</sub>	MS	F	b <sub>i</sub>		MS	F	b <sub>i</sub>
Isolates	8	7.70	7.13**		17.31	6.58**		9	26.95	53.47**	
Genotype + (Genotype x Isolates)	27	3.16	-		2.31	-		30	2.1	-	
Genotype (Linear)	1	60.47	89.50**		5.453	4.6 <sup>ns</sup>		1	37.32	21.57**	
Genotype x Isolates (Linear)	8	0.68	0.63 <sup>ns</sup>		1.2	0.45 <sup>ns</sup>		9	1.73	3.433*	
Pooled Deviation	18	1.08	27.06**		2.63	6.79**		20	0.504	19.385**	
TA1	2	0.450	11.29**	1.30	8.083	20.87**	0.73	2	0.22	8.46**	0.53±0.24
TA2	2	0.680	17.06**	0.80	0.273	0.7 <sup>ns</sup>	1.47	2	1.97	75.77**	2.36±0.73
TA3	2	0.240	6.02**	1.27	0.29	0.75 <sup>ns</sup>	1.76	2	0.09	3.46*	1.07±0.15
TA4	2	0.931	23.36**	0.84	1.7	4.39*	-1.09	2	1.38	53.08**	1.10±0.61
TA5	2	2.863	71.82**	0.92	3.1	8**	1.1	2	0.026	1 <sup>ns</sup>	0.29±0.08
TA6	2	0.574	14.40**	0.76	0.062	0.16 <sup>ns</sup>	0.35	2	0.33	12.69**	0.91±0.30
TA7	-	-	-	-			-	2	0.004	0.15 <sup>ns</sup>	0.06±0.03
TA8	2	2.030	50.93**	0.65	0.104	0.27 <sup>ns</sup>	0.34	2	0.50	19.23**	1.78±0.37
TA9	2	1.741	43.69**	1.60	7.92	20.45**	0.37	2	0.32	12.31**	0.72±0.29
TA10	2	0.232	5.82**	0.85	2.22	5.73**	4.012	2	0.12	4.62*	1.17±0.18
Pooled Error	64	0.040			0.387			72	0.026		

d.f.= degrees of freedom

bi=Coefficient of regression

MS=Mean of square

\*, \*\* and \*\*\* significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level.

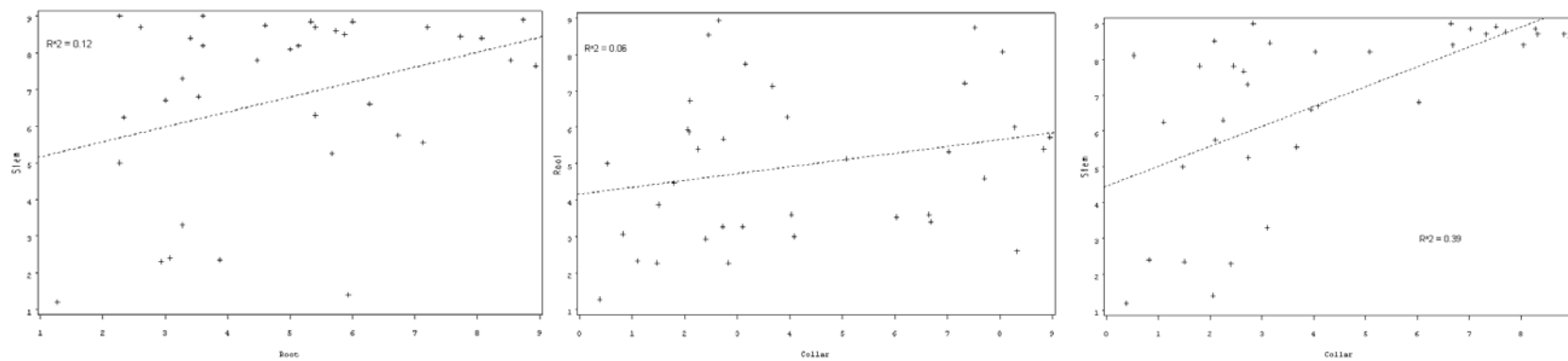


Fig 1. Regression plots of mean disease severity score of sunflower genotypes when inoculated with different isolates at the different tissues

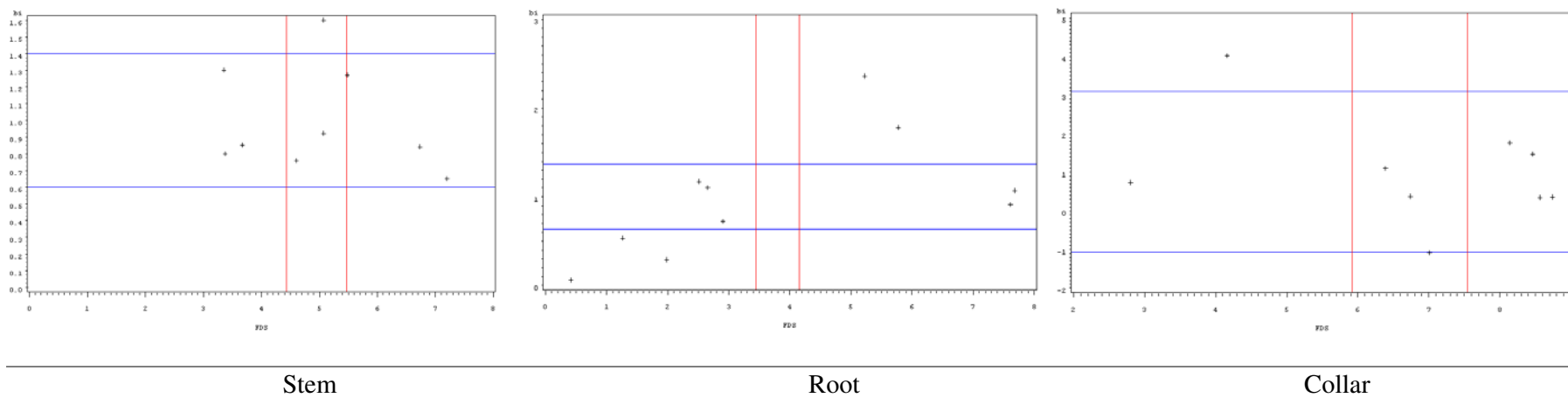
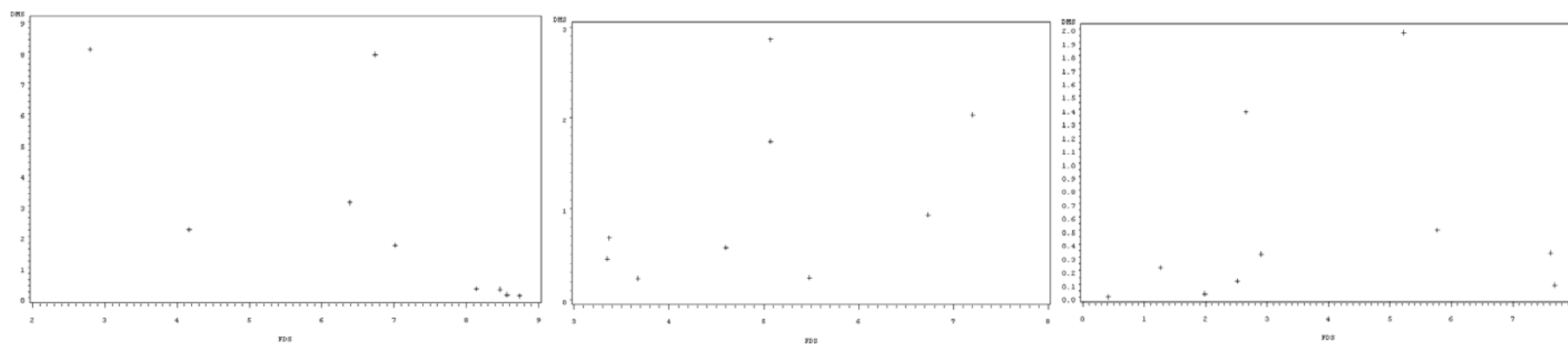


Fig 2. The relation of disease severity score and stability of virulence of 9 isolates of *Phoma macdonaldii* each on four sunflower genotypes. Blue collared horizontal lines are one standard deviation above and below the average slope ( $b_1 = 1$ ); vertical red collared lines are one standard deviation above and below the grand mean for disease severity score



Stem

Root

Collar

Fig 3. Plot of deviation mean square (indicator of the degree of specific gene interaction) against isolate means for virulence of 9 isolates of *Phoma macdonaldii* each on four sunflower genotypes



### III. Discussion

Notre étude de la variabilité phénotypique du champignon pathogène *Phoma macdonaldii* a permis de mettre en évidence une importante variabilité phénotypique, tant pour les souches sauvages que pour les souches transformées avec le gène de la GFP. Cette constatation est en accord avec les études précédemment réalisées par Roustae (1999) et par Larfeil (2003). Des résultats similaires ont été observés chez d'autres espèces de *Phoma* telles que *exigua* (Decogent, 1994), *lingam* (Hassan *et al.*, 1991) ou *medicaginis* (Angevain, 1984) et Grey *et al.*, 1990). Ces espèces présentent également une importante variabilité pour des caractères phénotypiques tels que la croissance et la pycnidiogenèse. *Phoma exigua* (Decogent, 1994) présente de fortes similitudes avec *Phoma macdonaldii*, surtout en ce qui concerne la croissance. En effet, ces deux espèces de *Phoma* sont capables de se développer dans une large gamme de températures (de 5 à 30°C), l'optimum de croissance étant de 25°C généralement.

D'autres études portant sur le *Phoma* du colza (Pound, 1947 ; Petrie, 1988 ; Delwiche, 1980 ; Koch *et al.*, 1989 ; Hill *et al.*, 1984 ; Sippel *et al.*, 1988 ; Hanacziwskyj et Drysdale, 1984) ont mis en évidence des corrélations entre les variations culturelles, morphologiques ou biochimiques et l'agressivité des souches. Par exemple, la croissance mycélienne (Cunningham, 1927) est plus importante chez les isolats peu agressifs. Ces résultats rejoignent ceux obtenus avec *Phoma macdonaldii* où l'on a démontré l'existence d'une corrélation négative entre l'agressivité des souches et la croissance à 25°C, à la lumière (Larfeil, 2003). De même, Swart *et al.* (1991) ont démontré l'existence d'une corrélation entre la vitesse de croissance *in vitro* et la virulence des souches de *Sphaeropsis sapinae* d'Afrique du Sud. Chez *Phoma bakeriana*, il existe un effet isolat sur la croissance des différentes souches de la même façon que pour *Phoma macdonaldii*. Par contre, lors d'études antérieures sur le *Phoma* du tournesol, aucune relation n'a pu être établie avec la morphologie culturelle des souches et toute autre caractéristique phénotypique. L'absence de corrélation entre

l'agressivité et la pycnidiogenèse, mise en évidence par Larfeil (2003) sur des souches polyspores, est en accord avec les résultats de Grey *et al.* (1990) sur *Phoma madicaginis*. *Phoma lingam* (Cunningham, 1927 ; Williams 1985 – 1992 ; Mengistu *et al.*, 1991), *Phoma medicaginis* (Angevain, 1984) et *Phoma exigua* var. *linicola* (Decognet, 1994) sont des champignons qui présentent également une importante variabilité au niveau de l'agressivité. Notons que pour *Phoma exigua*, la variabilité concernant l'agressivité se manifeste essentiellement par des différences de cinétique de développement de la maladie.

Les résultats présentés dans le cadre de notre étude rejoignent donc ceux obtenus par d'autres auteurs : les souches de *Phoma macdonaldii* ayant la croissance la plus faible sur milieu de culture en conditions axéniques ont le plus souvent un niveau d'agressivité élevé. Cette constatation peut être faite tant pour les souches sauvages que pour les souches transformées avec le gène de la GFP. On notera enfin que les souches transformées présentent par rapport à leur souche sauvage d'origine des modifications phénotypiques de sens et d'amplitudes variables. A ce titre, les souches transformées, et donc mutantes, dont l'agressivité a été amplifiée ou réduite, constituent des outils de choix pour aller rechercher les gènes impliqués dans la virulence et le pouvoir pathogène de *Phoma macdonaldii*.

Dans la seconde partie de ce chapitre, grâce à des analyses de variances individuelles réalisées pour chacun des tissus infectés (racines, collet et tige), nous avons pu montré qu'il existait des interactions significatives entre isolats et génotypes. Ceci suggère que la résistance à *Phoma macdonaldii* peut être isolat spécifique chez le tournesol et que le terme de virulence peut être utilisé dans le cas des isolats de phoma. De la même manière ces interactions indiquent une résistance verticale du tournesol à *Phoma macdonaldii*. Larfeil *et al.* (2002) ont montré que différents niveaux de résistance du tournesol étaient mesurés suivant la provenance géographique des isolats de l'agent pathogène. Ceci peut être expliqué par le fait que la probabilité de détecter un isolat qui diffère des autres augmente avec le nombre d'isolats testés, et cette probabilité augmente lorsque les isolats proviennent de lieux éloignés les uns

des autres. Des différences significatives entre isolats issus d'un petit échantillon suggèreraient un continuum dans l'agressivité des différents isolats.

Nos résultats ont également montré qu'il n'existait pas de relation étroite entre les réactions de la plante suite à une infection racinaire, une infection du collet ou une infection caulinare. En revanche des réactions extrêmement contrastées ont été observées entre les génotypes. Une hypothèse serait donc la présence de gènes de résistance tissu-spécifiques tout comme ça a été décrit dans les patosystèmes tournesol-*Sclerotinia* (Castano *et al.*, 1993) et tournesol-*Phomopsis* (Degener *et al.*, 1999). Dans ces pathosystèmes la résistance est indépendante dans la tige et dans les feuilles. Dans notre étude, la résistance du tournesol à la maladie des taches noires dépend i./ des isolats de l'organisme pathogène et ii./ du tissu infecté. Bert *et al* (2004) ont récemment montré que l'amélioration du tournesol pour la résistance au *Phomopsis* et à *Sclerotinia* était compliquée par le fait que ces deux pathogènes pouvaient attaquer différents organes de la plante et que les niveaux de résistance pouvaient varier suivant les organes considérés.

Nous pouvons supposer que différents mécanismes de résistance sont impliqués dans différents tissus et qu'une résistance accrue pourrait être obtenue en combinant ces résistances. Une autre hypothèse serait qu'au sein d'une population naturelle d'organismes pathogènes, il y a une sélection progressive des isolats qui sont plus agressifs sur certaines parties de la plante. Ceci pourrait également indiquer une modulation de l'agressivité de la population d'organismes pathogènes suivant les organes végétaux, et résultant de l'effet de facteurs environnementaux sur l'expression de la maladie.

***Étude histologique et cytologique  
de l'interaction  
Tournesol / Phoma macdonaldii***

## ***I- L'introduction***

L'interaction entre les champignons et les plantes peut être pathogène et dans ce cas la colonisation de la plante hôte se fait de différentes manières.

Des mécanismes complexes d'envahissement et de propagation définissent le pouvoir pathogène du champignon et agissent en plusieurs étapes :

- lors de l'adhésion sur la plante,
- lors de la colonisation du tissu végétal.

### **I-1- Les étapes de l'infection**

Fixation du champignon sur la plante hôte

L'adhésion des spores fongiques se déroule en 2 étapes :

**a-** Interactions hydrophobes entre la spore et la cuticule par des hydrophobies fongiques ou libération de composés adhésifs préformés comme chez *Magnaporthe grisea* (Tucker et Talbot, 2001).

**b-** Sécrétion d'un bio film ou d'une matrice extracellulaire qui est composé de sucres comme chez *Botrytis cinerea* (Doss *et al.*, 1995), de lipides, ou de protéines avec une activité enzymatique (Tucker et Talbot, 2001). Ainsi, chez *Uromyces fabae*, l'attachement des urédospores à la cuticule de l'hôte implique des estérases et une cutinase dégradant localement les polymères de surface (Deising *et al.*, 1992).

L'implication de ces enzymes a également été suggérée chez *Colletotrichum graminicola* (Pascholati *et al.*, 1993), chez *B. cinerea* (Van Kan *et al.*, 1997) ou chez *Erysiphe graminis* (Pascholati *et al.*, 1992).

Une fois que les spores ont adhéré, elles émettent un tube germinatif à la surface de la plante hôte. La germination mobilise les réserves lipidiques et glucidiques de la spore et aboutit à la formation éventuelle de structures infectieuses. La formation du tube germinatif repose sur la perception de signaux tels la dureté, l'hydrophobicité ou des molécules chimiques issues de la plante. La dureté de la surface de l'hôte rencontré est un stimulus important pour *M. grisea* (Xiao *et al.*, 1994)

L'hydrophobicité de la surface cellulaire en contact avec le champignon est donc un signal permettant la germination des spores mais également formation de l'appressorium. En effet, chez *Phyllosticta ampellicida* (Kuo et Hoch., 1996) et chez *M. grisea* (Jelitto *et al* ,1994 ; Beckerman et Ebbole, 1996), une corrélation existe entre le caractère hydrophobe du substrat et la germination de la spore, puis l'induction de la formation d'appressorium .

Les champignons pathogènes sont également capables de reconnaître la topographie de la surface cellulaire rencontrée dans le but de développer une structure se rapprochant de l'appressorium pour pénétrer dans la plante au contact des irrégularités de surface rencontrées au niveau des stomates.

Les champignons phytopathogènes peuvent également percevoir la présence de la plante par la reconnaissance des molécules qu'elle émet. Par exemple dans l'interaction entre *C. gloeosporioides* et l'avocat, la germination des spores et le développement de l'appressorium sont induits par la présence des monomères de cutine spécifiques de la plante hôte et par l'éthylène (Kolattukudy *et al.*, 1995).

Chez *Phoma macdonaldii*, lors de l'infection sur pétiole de cotylédon, il y a absence d'appressorium (Roustae, 1999) et la pénétration s'effectue directement au niveau de la cuticule (Roustae, 2000c, Larfeil, 2003 et Alignan ,2006)

## **I-2- La colonisation de la plante hôte**

Une fois le champignon dans la plante, celui-ci doit se nourrir et peut mettre en place différentes stratégies : il peut développer avec la plante hôte une relation biotrophe plus ou moins longue, caractérisée par un parasitisme modéré et qui peut précéder ou non une phase nécrotrophe. Les champignons développant directement la phase nécrotrophe colonisent et tuent les cellules dès les premières étapes de l'infection. Des vésicules d'infection sont différenciées, établissent des contacts avec les membranes plasmiques de l'hôte et permettent ainsi l'absorption de nutriments (Mendgen et Hahn., 2002). Le passage de la phase biotrophe à nécrotrophe serait la

conséquence de la réorientation de certains gènes et de la production d'enzymes de dégradation visant à libérer les nutriments nécessaires à la survie et à la prolifération.

La colonisation de la plante hôte est facilitée par la production de toxines, par la détoxification (l'inhibition) des composés de défense ou la production d'enzymes spécifiques.

Les toxines produites par les champignons provoquent la mort de cellules hôtes et facilitent ainsi la progression dans la plante. De nombreux champignons fabriquent des toxines non spécifiques agissant sur un grand nombre de plantes (Moss, 1996) alors que les toxines spécifiques actives uniquement sur la plante hôte ont été caractérisées chez plusieurs champignons phytopathogènes : *Cochliobolus* et *Alternaria* (Pedley et Walton, 2001).

La détoxification des composés antimicrobiens végétaux présents dans la plante (phytoanticipines) ou induits en réponse à une agression (phytoaléxines) (Idnurm et Howlett, 2001), est également impliquée dans le succès de la colonisation par certains champignons. Ces composés antimicrobiens vont gêner la progression du champignon et il peut les neutraliser par dégradation enzymatique ou par leur relargage dans le milieu extracellulaire. Les saponines, les glucosides cyanogènes, les glucosinolates sont des exemples de phytoanticipines présentes dans la plante et devenant actifs sous forme d'antibiotiques en réponse à une attaque microbienne. Les glucosides cyanogènes, produits par plus de 200 espèces de plantes (Morrissey et Osbourn, 1999), sont des précurseurs de l'acide cyanhydrique, qui est un poison respiratoire. Certains champignons ont la propriété d'être insensible au cyanure en ce qui concerne leur respiration ; d'autres sont capables de détoxifier l'acide cyanhydrique pour coloniser la plante.

L'implication des enzymes de dégradation de paroi, comme les pectinases, cellulases et xylanases dans le pouvoir pathogène a été recherchée chez plusieurs agents pathogènes (Walton, 1994). Elles vont agir sur les parois végétales et dégrader des polymères constituant cette paroi pour nourrir le champignon pathogène. Il a été montré que ces enzymes (xylanases et cellulases) n'ont pas un rôle important dans le

phénomène d'infection de la plante. En revanche, les pectinases n'ont pas la même influence sur la pathologie selon le type de symptôme, macération ou nécrose.

La microscopie photonique et la microscopie électronique permettent d'accéder à des informations ou des événements tels que l'évolution, dans des intervalles de temps, de la pénétration et de l'infection. Des informations plus continues sur le développement fongique dans la plante, peuvent être obtenues au moyen d'isolats transgéniques traceurs exprimant des gènes rapporteurs. Travailler avec des isolats exprimant la  $\beta$ -glucuronidase a permis d'en savoir plus sur certains pathosystèmes. Cependant, la découpe en sections des tissus et les autres manipulations expérimentales mises en œuvre pour visualiser l'activité du  $\beta$ -glucuronidase limite son utilité dans de telles analyses. Depuis peu, la GFP (green fluorescent protein) est devenue un outil de base dans les analyses plantes microorganismes (Lorang, 2001). Les spores et les hyphes des isolats fongiques exprimant la GFP peuvent être identifiés par microscopie à fluorescence dans des tissus vivants ou dans des sections de tissus sans utiliser de grosses manipulations, et permettent l'accès à des données très informatives sur l'évolution de la colonisation des plantes (Du, W, *et al*, 1999, Dumas, *et al*, 1999, Horowitz, 2002, Lagopodi, 2002, Maor, 1998)

Dans la présente étude, nous avons généré des isolats transgéniques *Phoma macdonaldii* exprimant la GFP, et les avons utilisés pour caractériser des états précoces de l'interaction avec le tournesol. L'utilisation d'isolats transgéniques exprimant la GFP a permis de visualiser directement le développement du champignon dans la racine et le collet de plantules de tournesol. Nous avons également caractérisé, la propagation du champignon dans les parties hautes de la plante. Ces analyses ont fourni de nouvelles informations sur la maladie, qui peuvent aider à expliquer le mode de pénétration et la colonisation des différents tissus à différents niveaux du tournesol. Cette étude a été réalisée par une approche comparative avec un génotype sensible (C150) et un génotype tolérant (C137).



## ***II- Résultats***

### ***II-1-Cinétique le pénétration de champignon***

Pour la cinétique de pénétration, nous avons sélectionné des zones de la racine au point d'inoculation (PI) et deux zones situées à 1 cm de part et d'autre de PI. Vingt-cinq plantes par répétition ont été observées, en sélectionnant dix coupes par plante. Nous avons effectué au total trois répétitions indépendantes dans les mêmes conditions.

#### **II-1-1 Infection de plantules de tournesol de la lignée sensible C150**

Des racines et des collets de plantules âgées de 10 jours, ont été infectés par un champignon exprimant la GFP (souche TA4-E). Le choix de cette souche est fondé sur les résultats de l'étude de la variabilité phénotypique. A J+2 après l'inoculation, on observe une colonisation massive du milieu de culture (Fig. 1A).

Au point d'inoculation (PI), le long de la racine, le champignon s'est développé et nous pouvons remarquer de longs hyphes ramifiés formant une épaisse couche sur la surface de la racine (Fig. 1B).

La densité de champignon colonisant la racine, diminue sensiblement à partir de 2 cm au delà du point de contamination (Fig. 1C, Fig. 1D).

Les racines secondaires, jusqu'à leur apex ont aussi été colonisées et les figures 1E et 1F montrent une distribution homogène du champignon le long de la surface. Des observations en microscopie électronique à balayage ont permis de voir des points de pénétration du champignon. Pour traverser la paroi des cellules épidermiques, nous n'avons pas observé de sites privilégiés de pénétration du champignon au niveau de la paroi tangentielle de la cellule ni sur les points de jonction de cellules ; les parois des cellules sont juste percées et aucune grosse altération de la cellule n'a été observée aux points de pénétration (Fig. 2B et Fig. 2C).

Des hyphes ont aussi été observés, cheminant dans la matrice de la paroi des cellules épidermiques, continuant à se développer (Fig. 2D et Fig. 2E).

En ce qui concerne la cinétique de pénétration du champignon, des sections transversales de racines ont été observées, sur plusieurs jours. Les images prises en microscopie fond clair et épifluorescence (Fig. 1G et Fig. 1H) montrent que 3 jours après inoculation le champignon pénètre dans la racine au niveau de l'émergence des racines secondaires, profitant de cette zone de fragilité où les cellules disjointes vont faciliter la colonisation de la racine par le champignon.

Dans la zone de pénétration du champignon, on observe, en microscopie fond clair, un brunissement des cellules (Fig. 1G), associé à une fluorescence jaune lorsqu'on observe la racine en microscopie à épifluorescence (Fig. 1H). L'infection a aussi lieu par les cellules épidermiques le long de la racine (Fig. 1I et Fig. 1J) et on observe également une contamination des cellules corticales, avec la présence du champignon et une émission de fluorescence jaune des cellules dans le cortex.

A 4 jours après inoculation, on observe une colonisation complète des cellules épidermiques et des premières rangées de cellules corticales (Fig. 1K et Fig. 1L) et la généralisation du brunissement des cellules infectées avec une fluorescence jaune des cellules dans le cortex en limite d'infection en réponse à la proximité du champignon.

Des observations réalisées en microscopie confocale ont permis de mieux suivre le champignon lors de sa pénétration dans les différents tissus. Des images réalisées à 5 jours après inoculation montrent que tous les tissus de la plante sont envahis et de nombreuses cellules du parenchyme cortical sont très abîmées (Fig. 3A, 3B, 3C). Nous observons également, dans le cylindre central, la présence de quelques hyphes dans des cellules du xylème et du phloème (Fig. 3B).

La propagation du champignon se fait donc de l'extérieur vers l'intérieur de la racine, mais on note aussi une évolution de la densité du champignon le long de l'axe longitudinal de la racine (Fig. 3C).

A 6 jours après inoculation, le champignon est alors présent dans tous les tissus de la racine et a fortement pénétré dans le cylindre central où on retrouve maintenant des hyphes fongiques dans les vaisseaux xylémiens (Fig. 3E, Fig. 3F).

La microscopie confocale a permis de montrer que les hyphes sont présents dans les cellules des différents tissus de la racine, mais aussi dans les matrices des parois cellulaires (Fig. 3H), ce qui est confirmé sur les observations faites sur des coupes semi fines du parenchyme cortical de la racine, colorées au bleu de toluidine (Fig. 3I). Dans le xylème, sur des coupes longitudinales, nous voyons aussi clairement le passage du champignon entre deux vaisseaux, entre les appositions de lignines (Fig. 3J).

Des résultats similaires ont été trouvés sur le collet, et une étude de la cinétique de pénétration a montré qu'à 5 jours après inoculation, tous les tissus étaient atteints (Fig. 4A, 4B, 4C, 4D).

La propagation dans le cylindre centrale se généralise à J+6 avec la détection d'hyphes fongiques dans les vaisseaux du xylème (fig.4D).

## **II-1-2- Infection de plantules de tournesol de la lignée tolérante C137**

Des plantules de tournesol de type C137, génotype tolérant, ont été inoculées par le champignon et une étude parallèle sur la cinétique de pénétration a été réalisée. Dans les conditions expérimentales précédemment mises au point, les premiers stades d'infection des plantules sont similaires entre les plantules de type sensible (C150) et celles de type résistant (C137).

Cependant, la différence est visible 5 jours après inoculation où on observe le champignon uniquement dans les tissus corticaux dans le cas des racines (Fig. 5A, 5B) et collets (Fig. 5E, 5F), du C137 (tolérant). Dans le cas du génotype sensible C150, le cylindre central est aussi colonisé.

A 6 et 7 jours après inoculation, la colonisation s'est généralisée en ce qui concerne le génotype C150. Les tissus phloémiques ainsi que le xylème sont infectés et quelques hyphes y sont visibles (Fig. 5C, 5D et Fig. 5G, 5H). Ces 2 tissus sont ensuite envahis par l'agent pathogène.

Une étude histologie générale sur la racine et le collet n'a pas permis de noter de différences significatives entre le C137 et le C150, mais des observations en microscopie champ clair et en microscopie électronique à transmission ont permis de

mieux décrire le processus de pénétration du champignon, ainsi que la réponse de la plante.

Les images faites sur des coupes transversales de racines C150 montrent la présence importante du champignon dans les tissus corticaux coté épiderme (Fig. 6A), ou coté interne proche du cylindre central (Fig. 6C). Le champignon est très fortement coloré au bleu de toluidine et on observe seulement quelques hyphes vides (coloration faible). La même observation sur des racines C137 fait apparaître de nombreux hyphes vides dans les différents tissus de la plante infectée, témoignant du fait que le champignon a du mal à progresser dans les tissus et meurt (Fig. 6B, et Fig. 6D).

Des observations à plus fort grossissement, en microscopie électronique à transmission, ont permis de décrire plus précisément le champignon, selon sa position, de l'épiderme jusqu'au cylindre central. Quelque soit le tissu considéré, le champignon présente le même aspect dans la racine du génotype sensible C150 (Fig. 7A à 7D) : les hyphes sont entourés par une paroi cellulaire fortement coloré au PATAG, sur sa partie externe. Une matrice extracellulaire diffuse a été observée quelquefois autour du champignon (Fig. 7B). Le centre de l'hyphe fait apparaître de nombreux grains de glycogène et de gros amas lipidiques.

En ce qui concerne les tissus de la racine du C137 (Fig. 7E à 7J), on note différents aspects morphologiques des hyphes selon la position du champignon dans les tissus. Au niveau épidermique, et dans la première couche du parenchyme cortical, la plupart des hyphes sont similaires à ceux décrits précédemment dans le C150, même si les corps lipidiques semblent être partiellement lysés et réduits en taille. Dans les autres cellules du cortex, d'autres types d'hyphes ont été observés. Certains hyphes sont entourés par une épaisse matrice extracellulaire fortement appliquée sur la paroi fongique (Fig. 7F). De plus, on note de nombreux grains de glycogène et juste quelques corps lipidiques partiellement lysés. Quelques hyphes laissent apparaître des trous au niveau de leur paroi (Fig. 7G). Les corps lipidiques ne sont pas colorés et apparaissent comme des vacuoles vides. Les grains de glycogène sont plus petits. Dans la partie interne du cortex (endoderme compris), et dans le cylindre central, les

hyphes sont dépourvus de granules de glycogène et les corps lipidiques sont très dégradés (Fig. 7H à 7I). La plupart des hyphes sont vides (Fig. 7J) : 40 à 45% des hyphes dans le cortex interne (comptage de 300 éléments), et 80 à 85% dans le cylindre central (comptage de 70 éléments).

Des hyphes vides ont aussi été observés dans les tissus de racine du C150, mais dans des proportions largement inférieures : 14 à 18 % d'hyphes vides dans tous le cortex interne et le cylindre central.

Des résultats similaires ont été observés dans le collet.

### III- Discussion

L'interaction entre le champignon pathogène et la plante hôte qui aboutit à la germination de la spore et à la croissance du tube germinatif, provoque des changements morphogénétiques qui vont permettre le développement de la virulence et la pénétration dans les cellules de la plante hôte par l'intermédiaire ou non d'un appressorium.

-*Fusarium oxysporum* produit sur la surface racinaire de la plante, des hyphes qui traversent la paroi des cellules épidermiques et colonisent la racine. (Rodriguez-Galvez et Mendgen, 1995).

-*Ustilago maydis* pénètre également par la cuticule en ne présentant que des changements

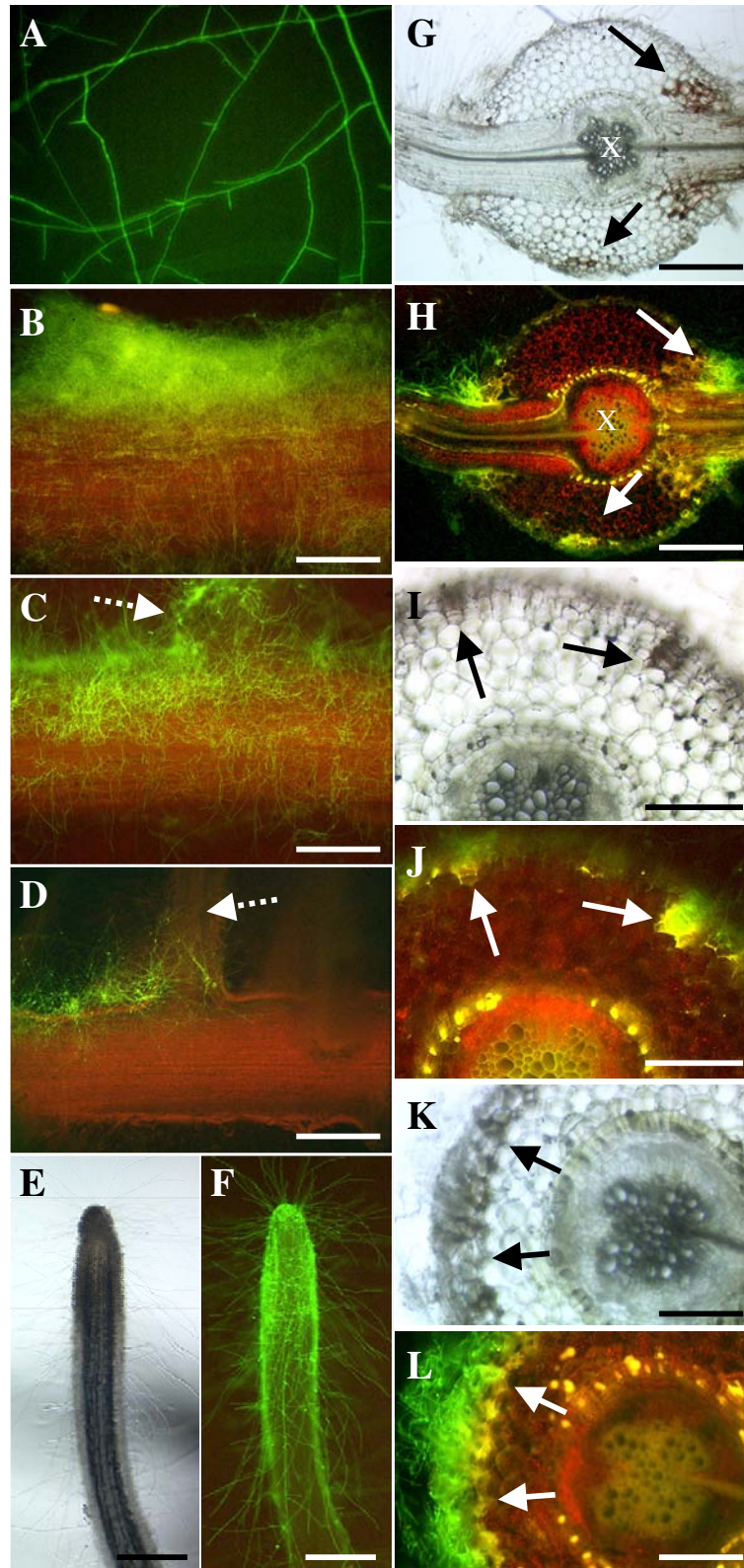
mineurs au niveau des hyphes infectieuses (Snetselaar et Mims, 1994)

La plupart des champignons phytopathogènes développent à l'extrémité du tube germinatif une structure spécialisée appelée appressorium permettant l'entrée du parasite dans la plante. Les champignons ne développant pas d'appressoria et pénétrant directement dans les cellules hôtes à travers la cuticule, nécessitent des cutinases et des enzymes de dégradation de la paroi végétale pour faciliter l'entrée des hyphes dans la plante. Le rôle des cutinases dans le processus d'infection du pois a été étudié chez *Fusarium Solani* f.sp *pisi* ( Li et al., 2002)

L'absence d'appressorium confirme les résultats de Roustae (1999). La pénétration s'effectue directement au niveau de la cuticule ou à travers les stomates (Roustae *et al.*, 2000c). Cela a également été observé chez *Phoma lingam* (Abadie et Boudart, 1982 ; Hammond *et al.*, 1985), *Phoma clematidina* (Van de Graaf *et al.*, 2002), *Phomopsis leptostromiformis* (Williamson *et al.*, 1991) ou même *Sclerotinia minor* et *sclerotium* (Lumsden et Wergin, 1980). Pour d'autres champignons, la pénétration s'effectue suite à la formation d'une structure spécialisée : l'appressorium. C'est le cas de *Phomopsis helianthi* (Muntanola-Cvetkovic, 1989), *P. phaseoli* (Kulik, 1988) et *P. longicolla* (Baker *et al.*, 1987), mais également de *Phoma exigua* (Decognet, 1994), *Septoria tritici* (Cohen et Eyal, 1993), ou encore *Ascochyta rabiei* (Höhl *et al.*, 1990).

On a vu que le champignon pénètre dans les deux organes (racine, collet). Lorsque la contamination a lieu sur le collet et racine, l'évolution est par la suite différente selon la sensibilité de la plante hôte linge C150. En effet, en ce qui concerne la durée d'incubation et la progression de l'agent pathogène dans l'hôte, il semble exister des différences selon la sensibilité du génotype contaminé. Chez la lignée la plus sensible, la durée d'incubation est beaucoup plus courte et le champignon pénètre plus en profondeur dans l'hôte jusqu'à atteindre les tissus conducteurs. Ce type d'observations, laisse supposer une évolution « systémique » partielle et localisée de la maladie, lorsque l'on observe le symptôme sur collet et racine. Cela rappelle, dans une moindre mesure, *Letosphaeria maculans* (Hammond *et al.*, 1985) et *Diaporthe helianthi* (Muntanola-Cvetkovic, 1989 – Heller et Gierth, 2001) dont les hyphes envahissent le système vasculaire des plantes, l'évolution de la maladie étant par la suite systémique. Il semble donc exister surtout des différences de cinétique selon la sensibilité du génotype. Cela doit être lié au fait que nous sommes dans un système de tolérance et non de résistance. Dans ce deuxième système, des réactions d'hypersensibilité se déclenchent sur les hôtes résistants, ce qui a pour conséquence généralement d'empêcher la progression du champignon avec une lignification des cellules alentours (*Leptosphaeria maculans*, Hammond et Lewis, 1986 ; *Septoria tritici*, Cohen et Eyal, 1983 ; *Ascochyta fabae*, Maurin *et al.*, 1993) et une accumulation de

composés phénoliques (*Ascochyta rabiei*, Höhl *et al.*, 1990) notamment. Chez *Phoma clematidina*, la croissance du tube germinatif est limitée dans la région subcuticulaire pour la variété tolérante alors que pour le génotype sensible, la croissance des hyphes n'est pas entravée.





**Figure 1 :** Microscopie champ clair et épifluorescence des plantules infectés de tournesol C150.

A : croissance du champignon exprimant la GFP sur le milieu de culture.

B à D : développement du champignon à la surface de la racine, au point d'inoculation (PI) (B), à 1cm du PI (C), à 2cm du PI (D) ( les flèches en pointillé indiquent les racines latérales ).

E à F : visualisation du champignon à l'apex racinaire en microscopie champ clair (E) et épifluorescence (F).

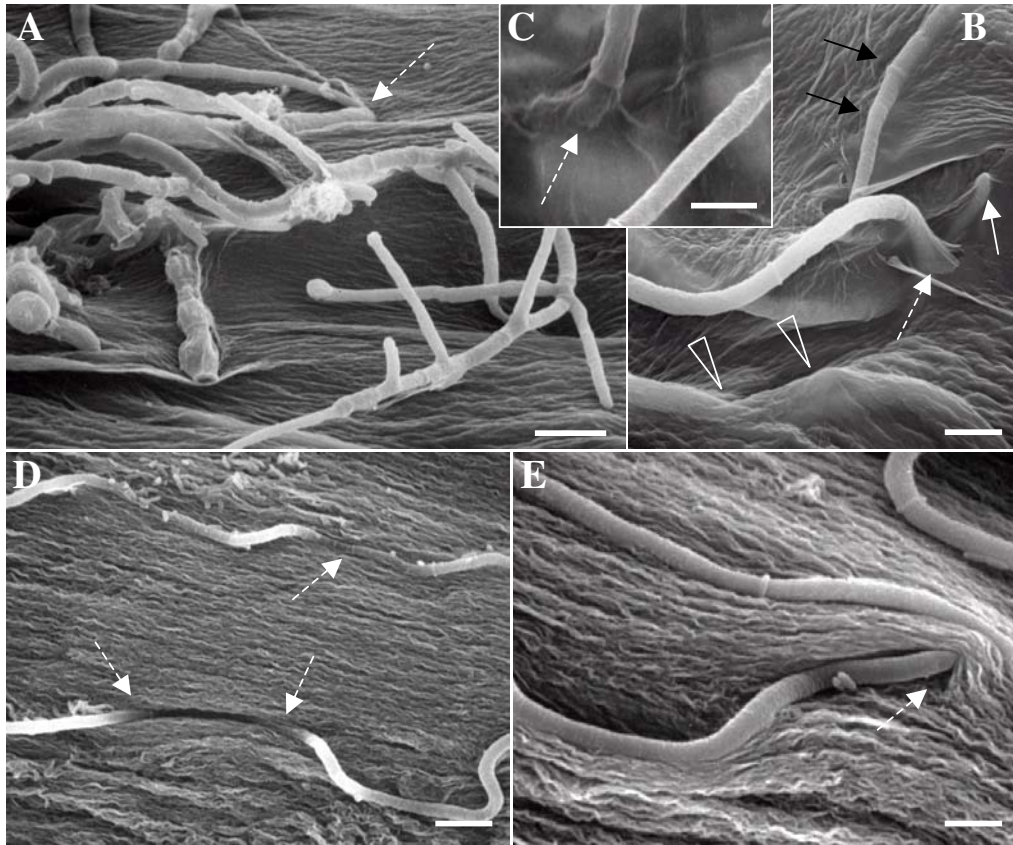
G à L : observations de racines latérales de racines C150 infectées, à 3 jours (G à J) et à 4 jours (K à L) après injection de spores. (G, I, K) microscopie champ clair, (H, J, L) microscopie épifluorescence.

Le champignon (en vert) pénètre dans la racine autour de l'émergence de la racine latérale (G et H). A noter la coloration brune sur les zones proches de la pénétration du champignon (G et L). Les spots jaunes très intenses en H et J correspondent au cadre de Gasparie du péricycle de la racine. Les flèches blanches indiquent la fluorescence induite en face des zones infectées.

Barres d'échelle : A à D = 500µm

G à H = 300µm

I à L = 150µm



**Figure 2 :** Microscopie à balayage des racines C150 infectées.

A : vue générale du champignon sur les cellules de surface du champignon

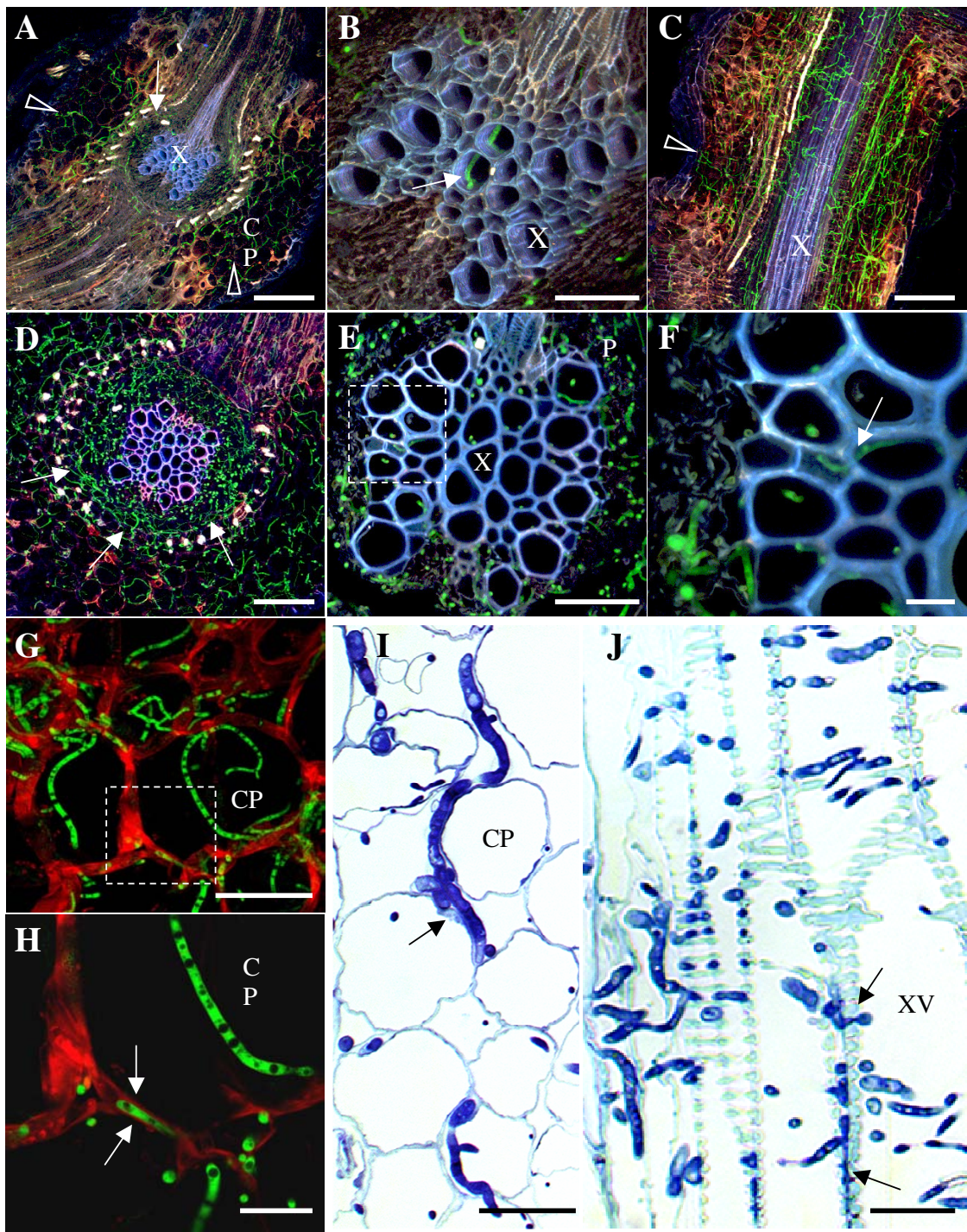
C et B détail de la pénétration du champignon (flèches pointillées), d'hyphes dans la matrice cellulaire de la plante (flèches pointes), d'une extrémité d'hyphe émergeant de la matrice de la paroi cellulaire (flèches blanches).

D et E : développement d'hyphes circulant dans la matrice de la paroi cellulaire (flèches pointillées).

Barres d'échelle : A = 10 $\mu$ m

B, C, E = 5 $\mu$ m

D = 15 $\mu$ m



**Figure 3 :** Microscopie confocale à balayage laser de racines C150, 5 jours (A à C) et 7 jours (D à F) après inoculation. Dans les tissus corticaux, des zones endommagées (flèches) ont été observées dans des sections transversales (A) et longitudinales (C). Les flèches montrent (A et D) des hyphes dans les tissus phloémiques (à noter, figure D, l'infection massive du phloème), et dans les vaisseaux du xylème (B et F). La figure F correspond à la zone encadrée de la figure E.

G à J : localisation du champignon dans la racine C150 en microscopie confocale (G et H) et en microscopie fond clair (I et J). Les hyphes sont localisées dans les cellules, dans le parenchyme cortical (CP) et entre les cellules (flèches en H et I). Dans le xylème, des hyphes ont été observés dans les vaisseaux, entre les vaisseaux (flèches pointillées) et circulant d'un vaisseau à un autre (flèche en J).

Barres d'échelle : A à C = 250µm

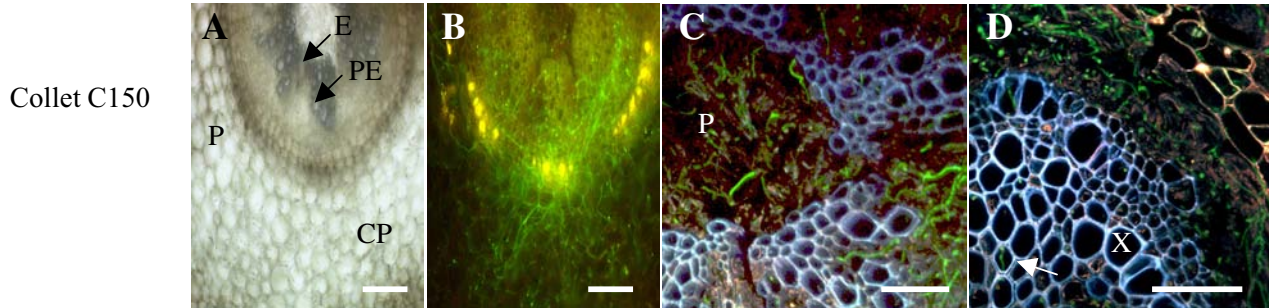
D et E = 100µm

F et H = 50µm

G = 200µm

I et J = 150 µm

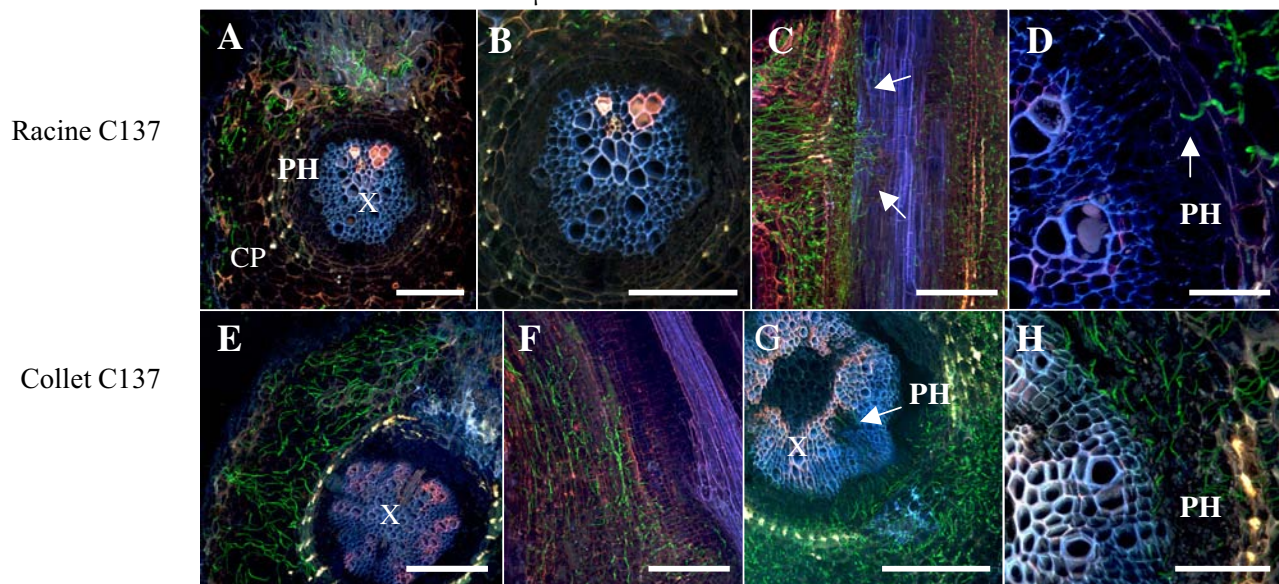




**Figure 4 :** infection de collets de plantules de tournesol de type C150, 5 jours (A à C) et 7 jours (D) après inoculation. A noter l'infection massive des tissus phloémiques (B), de la moelle (C) et la présence d'hyphes dans les vaisseaux du xylème (flèche en D) E: endoderme, PE: pericycle, PH: phloème, CP: parenchyme cortical, P: moelle, X: vaisseaux du xylème.

Barres d'échelle : A et B = 50µm

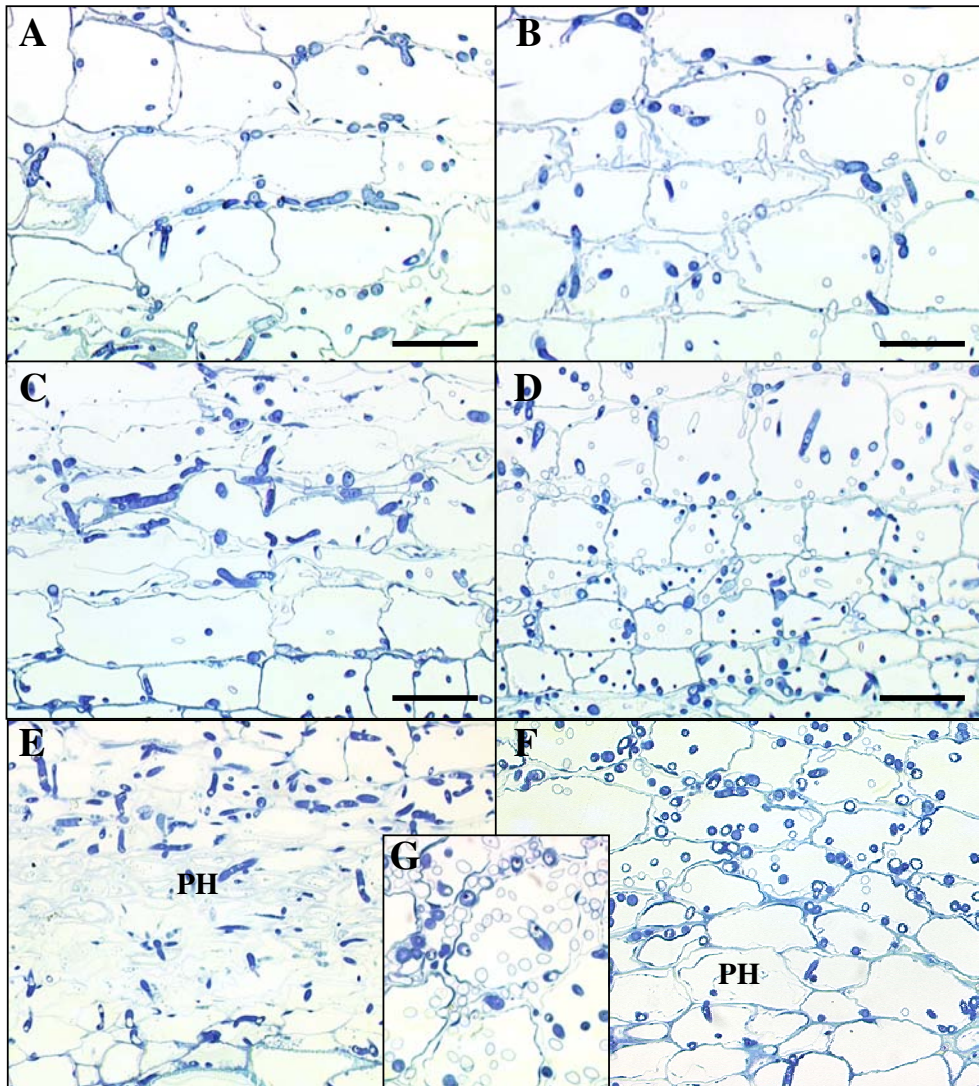
C et D =150µm



**Figure 5 :** infection de racines (A à D) et de collets (E à F) de plantules de tournesol de type C137, 5 jours (A,B,E,F) et 7 jours (C,D,G,H) après inoculation. A noter que l'infection dans le cylindre central se produit dans l'axe de la racine secondaire (C) . Dans la partie distale de la racine, le cylindre central est légèrement infecté (flèche en D indiquant la pénétration du champignon dans les tissus phloémiques). Dans le collet, les tissus du xylème sont légèrement envahis même après 7 jours (H). CP: parenchyme cortical, PH: phloème, X: vaisseaux du xylème.

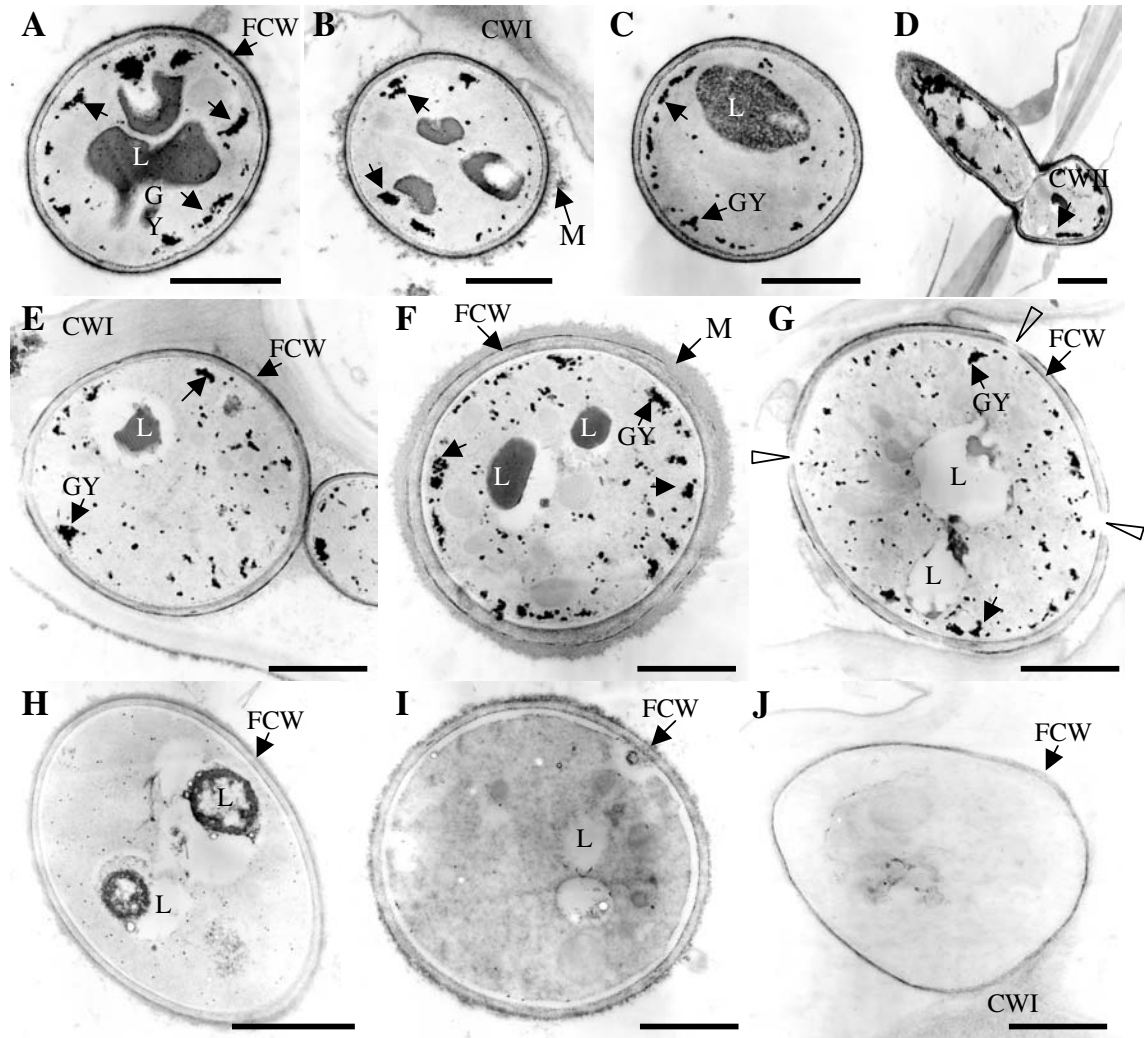
Barres d'échelle : A ,B,C, E, F, et G = 250µm

D et H =100µm



**Figure 6 :** sections semi-fines longitudinales colorées au bleu de toluidine, de plantules de tournesol de type C150 (A, C et E), de type C137 (B, D, F et G), observées 7 jours après inoculation. A et B, parenchyme cortical coté extérieur, C et D parenchyme cortical coté intérieur (au contact du cylindre central). E et F, parenchyme cortical coté interne, et partie du cylindre central du collet. G, détails de cellules du phloème de plantules infectées de type C137. A noter de nombreux hyphes vides dans les tissus de la plante C137. PH : phloème. Barre d'échelle : 250µm





**Figure 7 :** Microscopie électronique à transmission sur des hyphes colorées au PATAG, et provenant de tissus de racines C150 (A à D) et C137 (E à J) des plantules infectées. A noter les différents aspects des hyphes dans la couche épidermique (A et E), le parenchyme cortical coté extérieur (B,F et G), le parenchyme cortical coté interne (C, H et I), le phloème (J) et le xylème (D). FCW : paroi cellulaire fongique, CWI : paroi primaire de la plante, CWII : paroi secondaire de la plante.

# ***Génétique***

***Article 1 : Variabilité génétique de la résistance au Phoma chez le tournesol.***

***Article 2 : Contrôle génétique de la résistance partielle à la nécrose du collet et des racines causée par Phoma macdonaldii chez le tournesol.***

***Article 3 : recherche de QTLs contrôlant la résistance au Phoma***



## ***Introduction***

Le champignon mitotique sporulant *Phoma macdonaldii* (Mac Donald, 1964), l'agente responsable de la maladie des taches noires du tournesol (*Helianthus annuus*), a été rapporté dans plusieurs pays européen (Yougoslavie, Italie, Bulgarie, Roumanie) (Acimovic, 1984), asiatique (Iran, Pakistan, Chine) (Hua *et al.*, 1996 ; Siddique-Mirza *et al.*, 1988 ; Madjidieh-Ghassemi, 1998), aux Etats-Unis (Acomovic, 1984) et en Australie (Acimovic, 1984). Cette maladie est considérée comme l'une des plus préoccupantes du Tournesol en France (Peres *et al.*, 1996). Elle cause la maturation précoce associée à une perte de rendement de 10 à 30 % (Penaud, 1996), une réduction de la teneur en huile et du poids de 1000 grains (Carson, 1991). On peut également observer une mort prématurée de la plante (Smolik *et al.*, 1983 ; Donald *et al.*, 1987).

*Phoma macdonaldii* peut infecter différents tissus du tournesol, par l'intermédiaire de spores disséminées par le vent et la pluie (Maric et Schneider, 1979 ; Penaud, 1994). D'une manière générale, il infecte les feuilles basses et le symptôme le plus notable est une lésion noire à la base du pétiole. Le phoma peut également infecter le collet ainsi que le système racinaire des plantes, ayant pour résultante une lésion engainante au niveau du sol. Cela conduit à des plantes de taille réduite, dont la tige est grêle, à capitules petits, contenant moins de graines, dont la durée de vie est diminuée. Le contact direct avec des déchets infectés ou des résidus enterrés conduit à l'infection du collet et des racines.

A l'heure actuelle, des génotypes de tournesol ayant des degrés de résistance variés ont été décrits (Roustaei *et al.*, 2000b), mais aucun génotype totalement résistant n'a encore été identifié.

L'estimation de la variation génétique est utile afin de déterminer la valeur des lignées en amélioration génétique et ainsi choisir la procédure appropriée afin de développer des génotypes résistants au phoma.

Une variabilité génétique de la résistance partielle du tournesol au phoma a été décrite aussi bien en champs qu'en conditions contrôlées (Pérès *et al.*, 1994 ; Roustae, 2000a; Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Abou Al Fadil *et al.*, 2004; Bert *et al.*, 2004)). En conditions contrôlées, cette variabilité génétique a été mise en évidence grâce à des familles F3 issues d'un croisement entre un mutant, partiellement résistant et la lignée originelle correspondante, sensible (Abou al Fadil *et al.*, 2004). Roustae *et al.*, (2000a), par utilisation de génotypes parentaux et leurs hybrides F1, ont montré que la variation observée entre génotypes était due à l'aptitude générale à la combinaison (AGC). De ce fait, la majeure partie de la variabilité est attribuée à des effets additifs des gènes. Des lignées recombinantes (Recombinant Inbred Lines, RILs) dérivée d'un croisement entre les génotypes PAC-2 et RHA-266 ont été inoculées par un isolat français agressif de *Phoma macdonaldii* et 7 QTLs (Quantitative Trait Loci) furent identifiés (Rachid Al-Chaarani, *et al.* 2002). Ces QTLs permettaient expliquer 92% de la variation phénotypique de la résistance partielle du tournesol. Bert *et al.* (2004) utilisèrent des familles F2-F3 dérivées d'un croisement entre les génotypes PAZ2 et FU, et mirent en évidence 4 QTLs contrôlant la résistance au phoma.

Toutes les études génétiques mentionnées ci-dessus ont été réalisées suite à une inoculation des plantules de tournesol à l'aisselle des pétioles de cotylédons avec un isolat agressif de *Phoma macdonaldii* (MP6). Nous avons réalisé plusieurs expérimentations afin de déterminer le contrôle génétique de la résistance au phoma chez le tournesol qui sont les suivantes :

#### **1- Variabilité génétique de la résistance au Phoma chez le tournesol (article N° 1).**

L'induction de mutation par irradiation peut être une méthode efficace pour la création des mutants résistants au phoma. L'utilisation d'agents mutagènes chimiques est peu fréquente, le rayonnement gamma est à l'origine de 64 % des mutants par irradiation connus, suivi par les rayons X 22%) (Maluszynski *et al.*, 2000). Les mutants morphologiques ont occasionnellement une valeur agronomique et sont utilisés dans des programmes de sélection (Kohel et Biko, 2002). L'efficacité de l'obtention d'une nouvelle variation génétique pour un caractère donné dépend du

traitement mutagène, de l'efficacité des techniques de la méthode de sélection employé et bien entendu du fond génétique du phénotype d'origine (Fernandez-Martinez *et al.*, 1997). Chez le tournesol, différents mutants ont été étudiés, principalement des mutants nains ou à teneurs en huile modifiés (Jambhulkar, 2002 ; Miller et Vick, 1999 ; Peres-Vick *et al.*, 2000). Soldatov (1976) a développé le mutant « Perenets » à forte teneur en acide gras oléique. Fernandez-Martinez *et al.* (1997) ont créé un mutant (CAS-12) à haute teneur en acide palmitique (9.5%) comparé à la lignée parentale (2-4%). D'autres mutants ont été générés par mutagenèse contenant de plus fort taux d'acide gras saturés (Ivanov *et al.*, 1988 ; Osorio *et al.*, 1995). Des lignées males stériles utilisées dans la production de semences hybrides ont également été obtenues suites à des traitements mutagènes (Jan and Rutger, 1988 ; Jan, 1992).

Le but de cette partie de nos travaux est de définir la variabilité génétique de la résistance partielle du tournesol à la maladie des taches noires en utilisant des familles F3 issues d'un croisement entre un mutant partiellement résistant et la lignée d'origine, sensible, AS613.

## **2- Contrôle génétique de la résistance partielle à la nécrose du collet et des racines causée par *phoma macdonaldii* chez le tournesol (article N° 2).**

L'héritabilité de la résistance partielle du tournesol au *Phoma macdonaldii* suite à une inoculation au collet ou une inoculation racinaire n'a pas été rapportée dans la littérature. Cependant, la compréhension de ces phénomènes suite à tout type d'inoculation pourrait permettre de définir des programmes de sélection efficaces. Plusieurs lignées de tournesol et leurs hybrides F1 ont ainsi été confrontés à 4 isolats différents de *Phoma macdonaldii*. Les croisements diallèles, outils performants pour l'analyse génétique de caractères quantitatifs, ont été utilisés au cours de ce travail pour définir l'aptitude générale à la combinaison des lignées du tournesol pour la résistance partielle au phoma suite à des inoculations au collet ou racinaire.

### **3- : Identifier les QTLs qui contrôlent la résistance au Phoma (article N° 3).**

Durant les deux dernières décennies, les marqueurs moléculaires ont été utilisés avec succès afin de développer des cartes génétiques chez de nombreuses espèces végétales. Ces cartes génétiques permettent de détecter des loci contrôlant des caractères quantitatifs. Plusieurs cartes génétiques ont été construites chez le tournesol grâce à l'utilisation de marqueurs de types RFLP (Gentzbittel *et al.* 1995), AFLP (Flores Berrios *et al.* 2000) et microsatellites (Tang *et al.* 2002). Ces cartes ont permis la localisation de QTL impliqués dans un large éventail de processus tels, l'embryogenèse somatique, la photosynthèse et le statut hydrique, la teneur en huile des graines (Hervé *et al.* 2001 et Al-Chaarani *et al.* 2004). Des QTL associés à la résistance aux maladies ont été également identifiés tels ceux conférant la résistance à *Diaporthe hemianthii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phoma macdonaldii* et le mildiou (Rachid Al-Chaarani *et al.* 2002).

Des études précédentes portant sur la résistance partielles du tournesol au *Phoma macdonaldii* ont été réalisées par infection des pétioles de cotylédons par des spores du champignon. Cependant, la résistance partielle du tournesol au phoma racinaire au collet n'a pas encore été rapportée dans la littérature. Le but de nos travaux est l'étude du contrôle génétique de la résistance partielle au phoma du collet et racinaire et d'identifier des secteurs génomiques impliqués dans cette résistance.

***Genetic variability and heritability for resistance to black stem (Phoma macdonaldii) in sunflower (Helianthus annuus L.)***

**T. Abou Al Fadil , G. Dechamp-Guillaume, S. Pourmohamad Kiani,,A. Sarrafi \***

*Department of Biotechnology and Plant Breeding, BAP, INP-ENSAT, 18 chemin de Borde  
Rouge, BP 32607, 31326 Castanet, France; Fax: +33(0)5 62193581*

***Publié dans J.Genet. & Breed.58:323-328(2004)***

***\*Corresponding author: professor A. Sarrafi***

Department of Biotechnology and Plant Breeding, BAP, INP-ENSAT, 18 chemin de Borde  
Rouge, BP 32607, 31326 Castanet, France

Email: [sarrafi@ensat.fr](mailto:sarrafi@ensat.fr)

Tel: +33(0)5 62193580

Fax: +33(0)5 6219358

## Abstract

Seeds of “AS-613” inbred line were exposed to 75 grays of gamma rays and M1 and M2 plants were self-pollinated to obtain M3 generation. Among M3 Mutants, a relatively resistant line ‘M3-8’ was selected and crossed with ‘AS-613’. Seeds from this cross were grown and F1 plants were self-pollinated to produce F2 then F3 generation. 88 F3 families and two parents were used to determine the genetic variability of partial resistance to black stem in sunflower. Twelve- day-old seedlings were inoculated at the junction of the cotyledon petiol and hypocotyl with 20µl of pycniospore suspension. Seven days after inoculation both cotyledon petioles of the seedling were scored according to the percentage of the petiole area exhibiting disease symptoms (necrosis). Significant difference between the two parents, ‘M3-8’ and ‘AS-613’, indicates that mutagenesis can be considered as an important tool to produce genetic variation for resistance to Phoma in sunflower. Results showed that, the F3 families include extreme genotypes with relatively high resistance rate comparing with parents. 10% of F3 families showed a resistance rate higher than that of the best parent, indicating transgressive segregation for resistance to black stem among families. This also indicates the polygenic nature of resistance to black stem with a heritability value of 0.695.

**Key Words:** Mutation, sunflower, Phoma, Genetic variability, heritability, Genetic gain

## Introduction

There are many different descriptions for species of phoma mainly as saprophytes or facultative parasites of plants (SUTTON, 1980). The mitotic sporulating fungus *Phoma macdonaldii* (MCDONALD, 1964) the causal agent of black stem of sunflower (*Heliantus annuus* L.) has been reported from many European countries (Yugoslavia, Italy, Bulgaria, Romania) (ACIMOVIC, 1984), Asia (Iran, Pakistan, China,) (HUA *et al.*, 1996. SIDDIQUE-MIRZA *et al.*, 1988. MADJIDIEH-GHASSEMI, 1988), the United states (ACIMOVIC, 1984) and Australia (ACIMOVIC, 1984). Black stem is considered as one of the most serious diseases of sunflower in France (PERES *et al.*, 1996). It causes premature ripening associated with yield losses of 10 to 30% (PENAUD, 1996), and also in oil content and thousand seed weight reduction (CARSON, 1991). The disease can also cause premature plant death (SMOLIK *et al.*, 1983. DONALD *et al.*, 1987).

Generally, Phoma infects the lower leaves of sunflower, through spores spread by wind or rain (MARIC and SCHNEIDER, 1979; PENAUD, 1994). The most notable symptom of infection is a dark lesion at the base of the petiole; however, lesions have been recorded to occur on the plant head and leaves (MCDONALD, 1964). Phoma may also infect the root system of seedlings, resulting in a girdling lesion occurring at the soil level. This may result in stunted plants with thin stems, smaller heads, lighter and fewer seeds per head, blackened pith and frequently premature death (DONALD *et al.*, 1987). Phoma infects the plants through direct penetration via enzyme and toxin effects or mechanical pressure or indirectly through wounds or plant structural openings such as lenticels or stomata (ISAAC, 1992).

Estimation of genetic variation is useful in determining the breeding value of lines and choosing the appropriate procedure to use selected lines in breeding programmes. Genetic variability for partial resistance to black stem in sunflower has

been reported in both field and controlled conditions (PERES *et al.*, 1994. ROUSTAEI *et al.*, 2000). A study of parental genotypes and their F1 hybrids showed that additive genetic effects which are important in predicting the progeny performance of crosses were significant for some inbred lines used in the research work (ROUSTAEI *et al.*, 2000a).

Many induced mutants are released directly as new varieties; others are used as parents to derive new varieties.

Mutation induction with radiation is the most frequently used method to develop mutant genotypes. The use of chemical mutagens is relatively infrequent and gamma rays have been employed to develop 64% of the radiation-induced mutants followed by X-ray (22%) (MALUSZYNSKI *et al.*, 2000). Morphological mutants in plants occasionally have agronomic values and are used in crossing programs (KOHEL and BIKO, 2002). Intensive work on the induction of mutation by using irradiation, chemicals and other mutagenetic agents has been done in different species. Gamma irradiation has been widely used for inducing mutations in genetic studies and is applied in dry seeds, plantlets, tubers, bulbs and even complete plants (NOVAK *et al.*, 1988; BARAKET *et al.*, 2002). Induced mutants may have genes not previously identified at the mutational level, or may have novel alleles of previously described genes (ROBLES and MICOL, 2001). The effectiveness of obtaining a novel genetic variation for a given trait using mutagenesis depends on the mutagenic treatment, efficient screening techniques and also on the genetic background of the original phenotype (FERNANDEZ-MARTINEZ *et al.*, 1997). In sunflower, different mutants have been studied mainly dwarfism, high oleic oil and its oleic percentage (JAMBHULKAR, 2002; MILLER and VICK, 1999; PERES- VICK *et al.*, 2000. SOLDATOV 1976) developed the high oleic sunflower mutant “Perenets” by chemical mutagenesis using an alkylating agent. (FERNANDEZ-MARTINEZ *et al.*, 1997). Developed a sunflower mutant (CAS-12) with very high level of palmitic acid (9.5%) compared to the parental line (2-4%). Some other mutants have been obtained



with higher contents of saturated fatty acids after mutagenic treatments (IVANOV *et al.*, 1988; OSORIO *et al.*, 1995).

Male sterility of some lines used for hybrid seed production in sunflower was also obtained through mutation (JAN and RUTGER, 1988; JAN, 1992)

The aim of the present study was to determine genetic variability of partial resistance to black stem in sunflower using F3 families from a cross between a partial resistant mutant with its susceptible origin line “AS-613”.

## **Materials and methods**

The ‘AS-613’ inbred line was developed in our laboratory from a cross between two genotypes (ENSAT-125 and ENSAT-704). This line was selected for its high organogenesis response (SARRAFI *et al.*, 2000). The seeds of “AS-613” were exposed to gamma rays at the Atomic Energy Center (Cadarache, France) with a dose of 75 Grays. Irradiated seeds were grown in the field and M1 plants were produced which were self-pollinated. Seeds of each M2 plants produced M3 lines in the field. Among a population of about 2000 M3 lines, 120 M3 lines that showed morphological differences compared with “AS-613” were inoculated by an aggressive isolate of Phoma (MP6). A relatively resistant line, “M3-8” which did not show segregation for morphological characters was selected. Crosses were made between “AS-613” and “M3-8” mutant. Seeds from this cross were grown in the greenhouse and the F1 plants were self-pollinated to produce F2 seeds, which were planted in the field and self-pollinated seeds of eighty F2 plants produced F3 families which were used in this study with their two parents.

A monopycniospore isolate of Phoma (MP6) which is one of the most aggressive isolates of this pathogen produced by our department from naturally infected plants in southwest France (ROUSTAE *et al.*, 2000a), was used for this study. The experiment was carried out with 88 F3 families and two parents in a randomized block design with 3 replications in a controlled growth chamber at 25±1 (day)/18±1 (night)°C and a relative humidity of 70-80%. Light intensity was 200µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with a

14 h photoperiod. Seeds were sterilized for 5 min in 6% sodium hypochlorite solution and washed with sterile distilled water. Two rows of six seeds per F3 family or parents per replication were sown in plastic containers (40 × 30 × 30 cm) filled with moistened compost and irrigated normally. Twelve- day-old seedlings were inoculated at the junction of the cotyledon petiole and hypocotyl with 20µl of pycniospore suspension ( $10^6$  pycniospores per mL water containing 0.25% gelatine) using a micropipette.

After inoculation, each container was enclosed for 72 h using a special transparent cover (Plexiglas) to maintain a near-saturated humidity favorable for fungal infection. Small chlorotic lesions appeared on the surface of the cotyledon petiole 1-2 days after inoculation. Three days later they had elongated and transformed into necrotic lesions, depending on the reaction of the F3 families or parental lines. In severe infection of susceptible lines, the necrotic lesions elongated and then spread down the hypocotyl. Thus the percentage of surface area in the upper part of the cotyledon petiole occupied by the fungus varied with the susceptibility of the line. Seven days after inoculation both cotyledon petioles of the seedling were scored according to the percentage of the petiole area exhibiting disease symptoms (necrosis). A rating scale from 1 to 9, based on the percentage of infected cotyledon petiole area, was used, where 1 = 0-5%, 2 = 6-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-30%, 5 = 31-40%, 6 = 41- 60%, 7 = 61-80%, 8 = 81-99% and 9 = 100% with necrosis spreading down the stem (ROUSTAEI *et al.*, 2000b). The measures of severity did not need any transformation to normalize the distribution. Analysis of variance and Newman-Keuls test were performed for mean comparison of parents and families.

Heritability was estimated according to the following formula  $h^2 = 100 \sigma^2G / \sigma^2P$ , where  $\sigma^2G$  = genetic variance and  $\sigma^2P$  = phenotypic variance (KEARSEY and POONI, 1996) The mean of the F3 families and that of their parents were compared. Genetic gain expressed as the difference between the mean of F3 families, or the mean 10% selected families and the best parents was also determined for the studied trait.

## Results and discussions

Analysis of variance showed highly significant differences among the two parents and the F3 families whereas no significant effect was observed between replications (Table 1). The high significant mean square of genotypes (Table 1) shows that the F3 families present a high genetic variability for the studied trait. Significant differences between the two parents, the mutant line “M3-8” and “AS-613” (Table 2), indicate that mutagenesis can be considered as an important tool for producing genetic variation for resistance to Phoma in sunflower. The mean comparisons were made between F3 families (Table 2), and show which extreme genotypes with a relatively high resistance rate compared to their two parents. Partially resistant mutant families identified in our research may reflect the existence of a large number of genes which are directly or indirectly involved in resistance to Phoma, phenomenon which is also reported in *Arabidopsis* (SHARPINO, 2000). As far as we know mutants resistant to black stem in sunflower have not been reported previously in literature. A sunflower mutant resistant to rust has been reported (LOFGREN and RAMA RAJE URS, 1982). In other species a number of mutation-derived resistance to diseases has been successfully developed and incorporated into commercial cultivars, including *Fusarium* resistance in tomato (EVANS, 1989), powdery mildew resistance in barley (JORGENSEN, 1992), resistance to yellow and brown rust in wheat (BOYD *et al.*, 2002) and eyespot resistance in sugarcane (EVANS, 1989). F3 families presented a high variability (Table 2) for partial resistance to black stem ranging from very susceptible (8.6) to relatively resistant (4.1). The latter lines could be used in a breeding programme and for resistance to Phoma. The mean of parents and the mean of all F3 families as well as the mean performance of the best parent and the best 10% selected families were also compared (Table 3). The difference between all F3 families and their parents was not significant (Table 3), indicating that the 88 F3 families used in this study was large enough to be representative of all possible F3 families from the cross between the two parents. .comparison of the best parent with

the best family and with the 10% selected families had higher resistant rates than that of the best parent (Table 3), indicating transgressive segregation for resistance to black stem among families. This also indicates the polygenic nature of resistance to black stem and accumulation of favorable alleles in some F3 families. ROUSTAEE *et al.*, 2000a reported that several genes with additive and dominant effects, control resistance to Phoma in sunflower. The heritability of resistance to black stem in our study is 69.5 % and supports the level of heritability (66.4 %) reported by (ROUSTAEE *et al.*, 2000a) in their material. Selected mutant lines and F3 families, resistant to the disease are self pollinated each year and resistant lines produced can be used in crossing programmes for resistance to black stem.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Professor Catherine Carter (South Dakota State University) for English correction.

Table 1

Analysis of variance for partial resistance to black stem in 88 F3 families and their two parents in Sunflower

Source of variation	df	SS	MS
F3 and Parents	89	195.54	2.19***
Block	2	0.78	0.39 <sup>ns</sup>
Residual	178	61.01	0.34
Total	269	257.42	

\*\*\* and ns: Significant at P=0.001 and non significant

LSD (0.05) = 0.96

**Table 2:**  
Partial resistance to black stem in F3 families and two parents.

Parent or F3 family	$\bar{X}$	F3 family	$\bar{X}$	Parent or F3 family	$\bar{X}$
<b>AS613</b>	<b>8.60</b> a*	F3-38	7.60 efgh	A49	7.03 hijk
<b>M3-8</b>	<b>6.00</b> ijkl	A99	7.60 efgh	F3-78	7.03 hijk
F3-162	8.47 ab	A127	7.57 efgh	F3-58	7.00 hijk
F3-69	8.43 ab	A116	7.53 efgh	F3-103	6.97 hijk
F3-96	8.33 abc	A134	7.53 efgh	F3-8	6.97 hijk
F3-17	8.27 abcd	A44	7.47 efgh	F3-80	6.97 hijk
F3-106	8.23 abcd	A135	7.47 efgh	F3-112	6.90 hijk
F3-24	8.23 abcd	A23	7.47 efgh	F3-149	6.87 hijk
F3-88	8.23 abcd	A115	7.46 efgh	F3-20	6.77 ijkl
F3-107	8.20 abcd	A12	7.43 efgh	F3-136	6.77 ijkl
F3-10	8.17 abcd	A13	7.40 efgh	F3-132	6.73 ijkl
F3-5	8.17 abcd	A39	7.40 efgh	F3-7	6.70 ijkl
F3-16	8.13 abcd	A68	7.40 efgh	F3-104	6.68 ijkl
F3-4	8.13 abcd	A92	7.40 efgh	F3-129	6.67 ijkl
F3-50	8.13 abcd	A54	7.37 fghi	F3-35	6.60 ijkl
F3-126	8.13 abcd	A64	7.37 fghi	F3-70	6.50 ijkl
F3-32	8.07 bcde	A71	7.37 fghi	F3-145	6.47 ijkl
F3-133	8.03 bcde	A75	7.30 fghi	F3-138	6.37 ijkl
F3-36	8.00 cdef	A82	7.30 fghi	F3-108	6.24 ijkl
F3-41	7.97 cdef	A139	7.26 ghij	F3-97	6.23 ijkl
F3-94	7.97 cdef	A40	7.23 ghij	F3-93	6.07 ijkl
F3-128	7.90 defg	A59	7.23 ghij	F3-130	5.93 ijkl
F3-18	7.83 defg	A61	7.23 ghij	F3-76	5.73 ijkl
F3-109	7.80 defg	A83	7.23 ghij	F3-77	5.73 ijkl
F3-47	7.80 defg	A121	7.22 ghij	F3-131	5.70 ijkl
F3-42	7.77 defg	A53	7.20 ghij	F3-98	5.47 ijkl
F3-63	7.77 defg	A45	7.17 ghij	F3-81	5.40 jkl
F3-46	7.63 efgh	A62	7.17 ghij	F3-95	5.23 kl
F3-105	7.60 efgh	A73	7.13 ghij	F3-140	5.10 l
F3-19	7.60 efgh	A15	7.10 ghij	F3-143	4.10 m

\*Means followed by different letters are significantly different at the P=0.05 level (Newman- Keul test)

Table 3:

Item	Mean	Item	Mean
‘AS-613’	8.60	BF3	4.10
‘M3-8’	6.00	GG <sup>1</sup> =BF3-BP	-1.90*
‘AS-613’ – ‘M-38’	2.60*	10%BF3	5.44
$\bar{X} P = (\text{‘AS-613’} + \text{‘M-38’})/2$	7.30	GG <sup>2</sup> =10%BF3- $\bar{X} P$	-1.86*
$\bar{X} F3$	7.20	LSD (0.05)	0.96
$\bar{X} F3 - \bar{X} P$	0.10 <sup>ns</sup>	h <sup>2</sup>	69.5 %

Genetic gain and heritability for resistance to black stem in F3 families of sunflower

$\bar{X} P$ : Mean of parents

BP: Best parent (M3-8)

$\bar{X} F3$ : Mean of all families

BF3: Mean of the best F3 family

GG<sup>1</sup> and GG<sup>2</sup>: Genetic gain when the best F3 family or 10% of the selected families are compared with the best parent

h<sup>2</sup>: Percentage of heritability, ( $h^2 = 100 \sigma^2 G / \sigma^2 P$ )

LSD: Least significant difference

\* Difference significant at P=0.05

ns : Non significant.

## References:

- ACIMOVIC, M., 1984., Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia, 1981-1983. *Helia* 7:45-54.
- BARAKAT, M.N., EL-SHENNAWAY, O.A., RASLAN, M..R and ESMAIL, N.M., 2002. In vitro mutation for sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding. *Alexandria J.Agr. Res.* 47 : 77-84.
- BOYD, L.A., P.H. SMITH, A.H. WILSON, and P.N. MINCHIN., 2002. Mutations in wheat showing altered field resistance to yellow and brown rust. *Genome* 45: 1035–1040 (2002)
- CARSON, M. L. 1991. Relationship between *Phoma* black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Dis.* 75:1150-1153.
- DONALD, P.A., Venette, J.R., and Gulya, T.J., 1987. Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Dis.* 71:466-468.
- EVANS, D.A., 1989. Somaclonal variation : genetic basis and breeding application. *Trend Genetics.* 5: 46-50.
- FERNANDEZ-MARTINEZ, J., M. MANCHA, J. OSORIO, R. GARCES., 1997. Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic background. *Euphytica* 97: 113–116.
- HUA Z, and Ma G., 1996. A review of sunflower disease research in China. Beijing, China: Proceedings of the Fourteenth International Sunflower Conference 2: 754–759.
- ISAAC, S., 1992. Fungal-Plant Interactions. Chapman and Hall, London.
- IVANOV, P., D. PETAKOV, V. NIKOLOVA and E. PETCHEC., 1988. Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. p. 463–465. In: Proc. 12th Int. Sunflower Association, Toowoomba, Australia.
- JAMBHULKAR, S.J., 2002. An extreme dwarf mutant in sunflower. *Curr. Sci.* 83:116

- JAN, C.C., 1992. Inheritance and allelism of mitomycin C- and streptomycin-induced recessive genes for male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci* 32: 317–319.
- JAN, C.C. and J.N. RUTGER, 1988. Mitomycin C-and streptomycininduced male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci* 28: 792–795.
- JORGENSEN, J. H. 1992. Multigene families of powdery mildew resistance genes in locus Mla on barley chromosome 5. *Plant Breed.* 108:53–59.
- KEARSEY, MJ, and S. POONI, 1996. The Genetical Analysis of Quantitative Traits, pp. 116–119. Chapman & Hall, London.
- KOHET.RJ and BIRD L. S., 2002. Inheritance and linkage analysis of the yellow pulvinus mutant of cotton. *J. Cotton Sci.* 6:115-118.
- LOFGREN, J.R., and N.V. RAMA RAJE URS. 1982. Chemically induced mutations in sunflower. P.264-268. in *Proc. 10<sup>th</sup> Int. sunflower conf., surfers Paradise, Australia. 14-18 March. Int. Sunflower assoc., Paris,France*
- MADJIDIEH-GHASSEMI, S., 1988. Studies on some important fungal diseases of sunflower in Iran. Pages 22-23 in: *Proc. 12th Int. Sunflower Conf., Novi-Sad, Yugoslavia International Sunflower Association, Paris, France.*
- MALUSZYNSKI, M., K. NICTERLEIN, L. VAN ZANTEN and B. S. AHLOOWALIA., 2000. Officially released mutant varieties- the FAO/IAEA Database. *Mut Breed rev* 12: 1-84
- MARIC A, SCHNEIDER R., 1979. Die Schwartzfleckenkrankheit der Sonnenblume in Jugoslawien und der Erreger *Phoma macdonaldii* Boerema. *Phytopathologische Zeitschrift* 94, 226–233.
- MCDONALD, W.C., 1964. Phoma Black Stem of Sunflower. *Phytopathology.* 54: 492-493
- MILLER, J.F., and VICK, B.A., 1999. Inheritance of reduced stearic and palmitic acid content in sunflower seed oil. *Crop Sci.* 39:364-367.



- NOVAK, F.J., DASKALOV, S., BRUNNER, H., NESTICKY, M., AFZA, R., DOLEZELOVA, M., LUCRETTI, S., HERICHOVA, A. and HERMELIN, T., 1988. Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. *Plant Breed.* **101**:66-79.
- OSORIO, J., J. FERNANDEZ-MARTINEZ, M. MANCHA and R. GARCES, 1995. Mutant sunflower with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Sci* 35: 739-742.
- PENAUD, A., 1996. Phoma du tournesol: Recherche des époques de contamination et mise au point de la protection fongicide. Pages 694-699 In: Proc. 14th Internat. Sunflower Conference. Beijing, China, International Sunflower association, Paris, France.
- PERES A, ALLARD AM, DEVERCHE·RE J, PENAUD A., 1994. Phoma du tournesol: etude de la protection fongicide au champ. In: 4ème Conference Internationale Sur les Maladies Des Plantes, Bordeaux, France. Paris, France: Association Nationale de Protection des Plantes, 1179-1185.
- PERES, A., and LEFOL, C., 1996. *Phoma macdonaldii* Boerema: Eléments de biologie et mise au point d'une méthode de contamination artificielle en conditions contrôlées. Pages 687-693 In: Proc. of the 14th Internat Sunflower Conference. Beijing, China. International Sunflower association, Paris, France.
- PEREZ-VICH, B., GRACES, R. and FERNANDEZ-MARTINEZ, J.M., 2000. Genetic characterization of sunflower mutants with high content of saturated fatty acids in seed oil. *Helia*. **23**:77-87
- ROBLES, P. and MICOL, J.L., 2001. Isolation and characterization of fast-neutron induced mutants with abnormal leaf morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Dev. Biol.* **45** :59-60
- ROUSTAE, A., COSTES, S., DECHAMP-GUILLAUME, G., and BARRAULT, G., 2000a. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph: *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathol* **49**: 227-234
- ROUSTAE, A., BARRAULT, G., DECHAMP-GUILLAUME, G., LESIGNE, P and SARRAFI, A., 2000b. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii* L.) in sunflower. *Plant Pathol* **49**: 396-401

- SARRAFI, A., KAYYAL, H., RACHID AL-CHAARANI, G., CANTIN, F., CHALINE, A. S. and DURIELLE, A.S., 2000. Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower ( *Helianthus annuus* L.). *J. Genet. Breed.* **54**:227-231
- SIDDIQUE-MIRZA, M., MASOOD, A. R., and AYUB, M., 1988. Sunflower diseases in Pakistan in the period 1980 to 1987. Pages 2-25 In: Proc. 12th Inter. Sunflower Conf., Novi-Sad, Yugoslavia , International Sunflower Association, Paris, France.
- SHARPINO, A.D., 2000. Using *Arabidopsis* mutants to delineate disease resistance signalling pathways. *Can. J. Plant Pathol.* **22**:199-216.
- SMOLIK, J. D., WALGENBACH, D. D., and CARSON, M. L., 1983. Initial evaluations of early dying of sunflower in South Dakota. Pages 24-25 In: Proc. Sunflower Res. Workshop, Fargo.
- SOLDATOV, K.I., 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. In: Proceeding of the VIIth International sunflower Conference. Vol. 1. Krasnodar, pp. 352-357
- SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew. UK. pp.696

# **Genetic control of partial resistance to collar and root necrosis caused by *Phoma macdonaldii* in sunflower**

**T. Abou Al Fadil, G. Dechamp-Guillaume, R. Darvishzadeh and A. Sarrafi \***

*Department of Biotechnology and Plant breeding, BAP, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde  
Rouge, BP 32607, 31326 Castanet, France*

**Accepté à European journal of plant pathology**

Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi

*Department of Biotechnology and Plant breeding, BAP, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde  
Rouge, BP 32607, 31326 Castanet, France*

*E-mail : [Sarrafi@ensat.fr](mailto:Sarrafi@ensat.fr)*

*Phone: + 33562193580*

***Fax: + 33562193581***

*Key words: combining abilities, F1 hybrids, genotype-isolate interaction,  
inheritance, *Helianthus annuus* L.,*

## Abstract

*Phoma macdonaldii* Boerema is one of the most important sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogens in France. In order to determine the inheritance of resistance to the disease five sunflower genotypes with wide genetic variability for resistance to the disease were crossed in a diallel programme. Two separate experiments were undertaken in a controlled growth chamber. In the first one, the response of parental genotypes and their F1 hybrids were evaluated with two phoma isolates selected for collar necrosis whereas in the second experiment, they were inoculated with two phoma isolates selected for root necrosis. Analysis of variance was performed to determine the effects of genotype, isolate and their interactions on disease severity score in collar or root inoculations. General combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) effects for resistance to collar and root necrosis were highly significant for each of four isolates indicating that both kinds of gene effects were important in controlling the resistance to collar and root necrosis. The GCA/SCA ratios were more than one for three out of four isolates showing that additive genetic effects were more important than non-additive ones for resistance to the studied phoma isolates. However, in the case of TA4 root isolate the ratio was less than one indicating the importance of non-additive gene effect for resistance. Which is very useful for F1 hybrid production.

## Introduction

*Phoma macdonaldii* Boerema is one of the most important sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogens in France (Debaeke and Pérès, 2003). Generally, phoma infects the lower leaves, either by wind or rain-splashed spores (Gulya et al., 1997). Once the infection reaches the stem, a black round to oval lesion forms, reaching a maximum diameter of 5 cm. The spot may eventually girdle the stem, although the lesions generally affect only the epidermal layer and do not penetrate into the pith. Yield losses due to phoma black stem lesions are moderate ranging from 0.2 to 0.7 t ha<sup>-1</sup> (Penaud, 1996). Phoma also infects the collar and the root system of plants, leading to a girdling lesion at the soil level. This may result in stunted plants with thin stems, smaller heads, lighter and fewer seeds per head, blackened pith, and frequently premature death (Donald et al., 1987). The above-mentioned symptoms referred to as 'early death' or 'premature ripening' which are observed in France and yield losses up to 1.3 t ha<sup>-1</sup> have been recorded in such conditions (Pérès et al., 2000). Direct infection by contact with infected shallow or buried residues with stem base or the roots results in collar and root disease symptoms (Poisson-Bammé and Pérès, 2000). Genetic variability for partial resistance to phoma black stem in sunflower has been reported in both field and controlled conditions (Pérès et al., 1994; Roustaei, 2000a; Rachid Al-Chaarani et al., 2002; Abou Al Fadil et al., 2004; Bert et al., 2004). Genetic variability for resistance to phoma black stem has been observed in F3 families from a cross between a partial resistant mutant with its susceptible original line in controlled conditions (Abou Al Fadil et al., 2004). Roustaei et al. (2000a) using parental genotypes and their F1 hybrids showed that the variation among genotypes studied is due to the general combining ability (GCA) and thus most of the variation is attributed to additive effects. Recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross between PAC-2 and RHA-266 genotypes were inoculated by an aggressive French isolate of phoma black stem and seven quantitative trait loci (QTL) were identified (Rachid Al-Chaarani et al., 2002). The detected QTLs together explained 92% of the

phenotypic variation of the trait. Bert et al. (2004) using F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub> families derived from a cross between PAZ2 and FU genotypes detected four QTLs controlling phoma black stem resistance. All the above-mentioned genetic studies have been realized using plant materials inoculated at the junction of the cotyledon petiole and hypocotyls by aggressive French isolate of *Phoma macdonaldii* (MP6). The authors are not aware of any previous reports about the inheritance of partial resistance to collar and root necrosis. Understanding the inheritance of disease resistance will help to design an effective breeding programme. The diallel cross analysis is an efficient instrument in the genetic analysis of quantitative characters. This study aimed to determine combining abilities for partial resistance to collar and root necrosis among selected sunflower lines and their F<sub>1</sub> hybrids inoculated by 4 different isolates of *P. macdonaldii*.

## **Material and methods**

### *Genotypes and phoma isolates*

Genotypes used in this study present a high genetic variability in their susceptibilities to phoma collar and root necrosis isolates on the basis of our preliminary studies. M6-54-1- is one of the mutant lines developed by seed irradiation of 'AS 613' genotype with gamma rays in our department (Sarraf et al., 2000). ENSAT-B5 and ENSAT-R5 are inbred lines selected in our crossing programmes. B454/03 is an inbred line introduced from Hungary. These five genotypes were crossed in a diallel mating system without reciprocals to produce 10 F<sub>1</sub> hybrid combinations.

Sunflower collar fragments collected from ten different French geographical origins showing collar characteristic symptoms were surface-sterilized for 5 minutes in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees), washed three times (5 min) in sterile distilled water, and transferred to Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) (39 g l<sup>-1</sup>, pH 6) and incubated for 10 days at 25°C under alternating periods of

illumination (12 h,  $37 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Philips TLD 15 W 33 lamps) and darkness to induce sporulation. Single pycnidiospores isolates were prepared by serial dilutions (Roustaei et al., 2000b) and cultured on PDA for further subculture. To allow mycelial growth, single pycnidiospores isolates cultures were placed on V8 medium (Agar  $20 \text{ g l}^{-1}$ , V8  $200 \text{ ml l}^{-1}$ , pH6) and incubated for 7 days at  $25^{\circ}\text{C}$  in the dark. Conservation of isolates was done using the method described by Roustaei et al. (2000 b). A healthy sunflower stem fragment, sterilized at  $110^{\circ}\text{C}$  for 25 min, was placed on a culture of a monospore isolate on potato dextrose agar (PDA). Pycnidia were visible on the stem fragment after incubation for 15 days at  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  under a cycle of 12 h illumination ( $37 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and 12 h darkness. When these fructifications developed, the stem fragment was placed in a sterile haemolysis tube. Tubes were closed with an absorbent cotton plug, covered with an aluminium foil and kept in the dark at  $4^{\circ}\text{C}$ . Of 10 single pycnidiospores isolates obtained from sunflower collar fragments presenting symptoms, which were collected from ten different regions in France, four isolates (two for collar and the two others for root) were selected on the basis of their aggressiveness on the five parental genotypes in preliminary experiments and used in this study. These 4 isolates were derived from samples collected from center (Loir and Cher) and west (Vendée) regions of France in 1997.

### **Collar inoculation**

The response of parental genotypes and their F1 hybrids were evaluated in two separate experiments. Which were done at the same time and the same conditions. In each experiment the plant materials were inoculated by one of the two selected isolates (TA4 and TA8). The experimental design was randomized complete block with three replications. Each replication consisted of 10 plantlets. Seeds of sunflower genotypes were sterilized for 5 min in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees) and washed in sterile distilled water. Two rows of five seeds per genotype per replication were sown in plastic containers. The experiments were conducted in a controlled environment chamber ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  day,  $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$  night and a relative

humidity of 75-80%). Light intensity was  $200 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$  with a 14 h photoperiod. A disc of mycelium (6 mm diameter) was placed beside the collar of 12 days-old sunflower plantlets (first pair of developed leaves). After inoculation, each container was enclosed for 48 h using special transparent cover (plexiglass) to maintain a near-saturated humidity favorable for fungal inoculation. The development of lesions was evaluated seven days after inoculation, on a 1-9 scale for the percentage of necrotic area on one centimeter of the stem days and all around it where: 1= 0-5%, 2=6-10%, 3= 11-20%, 4=21-30%, 5=31-40%, 6=41-60%, 7=61-80%; 8=81-99% and 9= necrosis all around the stem base and spreading up more than one centimeter.

### **Root inoculation**

Two other experiments were undertaken each with one of the phoma isolates selected for root inoculation (TA6 and TA9) at the same time and the same conditions. The experimental design and seed sterilization were the same as explained for collar inoculation. Seeds were sown in Magenta boxes (one plantlet per box) containing Murashige and Skoog medium ( $4.4 \text{ g l}^{-1}$ ), solidified with  $2.8 \text{ g l}^{-1}$  phytigel (Sigma). Experiments were performed in a growth chamber ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  days,  $18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  night) with 75-80% relative humidity and 14 h photoperiod with  $200 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$  light intensity provided by NAV-T 600W lamps Osram-Vialox, Molsheim, France. Twelve-days-old plantlets were inoculated by 20 microliters of a pycniospore suspension ( $10^6$  pycniospores per ml of water containing 0.25% gelatin) added to the medium near the root using a syringe. The development of symptoms was scored on a 1-9 scale for the length of necrotic area seven days after inoculation, where: 1 = 0-0.5cm, 2 = 0.5-1cm, 3 = 1-1.6cm, 4 = 1.7-2.2cm, 5 = 2.3-2.8cm, 6 = 2.9-3.4cm, 7 = 3.5-4cm, 8 = 4.1 - 4.6cm, 9 = 4.7-6 cm necrosis area on the roots.

### **Statistical analysis**

Disease severity score of collar inoculation were transformed by square root ( $\sqrt{x}$ ) to normalize the data distribution. In the case of root inoculation the distribution of the data for disease severity were normal and did not need any transformation. As it is



mentioned the experiments were done at the same time, in the same growth chamber and steady condition in term of temperature, relative humidity and light intensity. To determine the effects of genotype, isolate and their interaction on disease severity score in collar or root inoculation, analysis of variance based on the balanced completely randomized split plot design was performed. Phoma black stem isolates are considered as the main-plot and genotypes as the subplot factor. Then, to provide host reaction to phoma isolates, analysis of variance for each isolate was performed separately using randomized complete block design. Diallel analysis was conducted according to Griffing's Method 2 and Model 1 (Griffing, 1956) using the SAS programme for Griffing's diallel analysis (Zhang and Kang, 1997). The statistical model is the following:

$$Y_{ij} = \mu + \lambda_i + \lambda_j + S_{ij} + e_{ij}$$

Where:  $\mu$  = general mean effect;  $\lambda_i$  ( $\lambda_j$ ) = general combining ability (GCA) of the  $i$ th ( $j$ th) parent;  $S_{ij}$  = specific combining ability (SCA) of the cross between the  $i$ th and  $j$ th parent; and  $e_{ij}$  = residual. The Newman-Keuls test was used for comparing mean performance of parents and F1s. However, the mean values for disease severity score in the collar experiment are presented in the tables as nontransformed data to indicate the real infection rate.

## Results and Discussion

Split plot analysis of variance presented in Table 1 showed the occurrence of significant difference between genotypes (parents and their F1 hybrids) for partial resistance to phoma collar and root necrosis. The difference between the two isolates was not significant for collar necrosis whereas the effect of isolate was significant for black root necrosis. Highly significant interactions were observed between genotype/isolate in both programmes. Analysis of variance for each of four isolates separately presented in Table 2 show significant difference among parents and F1 hybrids for disease severity score indicating that collar and root necrosis partial resistance is genetically controlled in the genotypes tested. Means of disease severity

(Table 3) show that parental lines ENSAT-B5 and B454/03 were partially resistant to three out of the four isolates studied. ENSAT-R5 had partial resistance to collar necrosis isolates whereas it was susceptible to root necrosis isolates. AS613 and its mutant line M6-54-1 were susceptible to both collar isolates and also to one of the root isolates and showed partial resistance to TA8 root isolate. These results confirm the genetic variability for partial resistance to *Phoma macdonaldii* reported also previously for Phoma black stem in both field and controlled conditions (Pérès et al., 1994; Roustaee et al., 2000a; Rachid Al-Chaarani et al., 2002; Abou Al Fadil et al., 2004; Bert et al., 2004). F1 hybrids presented a continuous range of susceptibility from partially resistant to very susceptible (Table 3). ENSAT-B5 x ENSAT-R5 has partial resistance to collar isolates whereas it was susceptible to root isolates. Conversely, AS613 x M6-54-1 was susceptible to collar isolates whereas it has partial resistance to root isolates. B454/03 x M6-54-1 showed partial resistance to one of the collar and one of the root isolates and was susceptible to the two other isolates. ENSAT-R5 x AS613 has partial resistance to three out of four isolates and ENSAT-R5 x M6-54-1 was susceptible to two of these isolates.

Mean square values of general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) revealed that the variance due to GCA and SCA were highly significant for each of the four isolate studied (Table 2). Thus, both kinds of gene effects were important in controlling the inheritance of resistance to collar and root necrosis. However, the GCA/SCA ratios are more than one in three out of four isolates. This indicates that the additive gene effects are more important than non-additive ones in controlling partial resistance to collar and root necrosis isolates. Assessing the contribution of individual lines to hybrid resistance was accomplished by comparing the GCA effect among the parents (Table 3). A parent with a significant negative GCA value would contribute a high level of resistance whereas a parent with a positive value would contribute a high level of susceptibility. ENSAT-B5 showed highly significant negative GCA values for three out of four isolates. AS613 and its mutant line M6-54-1 exhibited highly significant positive GCA values for both of

collar isolates whereas GCA had negative values in both cases for AS613 and only for TA8 isolate for the mutant line in root inoculation programme. ENSAT-R5 exhibited highly significant negative GCA value for collar necrosis isolates whereas GCA value was positive for TA4 root isolate. In order to accumulate favourable genes in a new germplasm it will be pertinent to cross the lines, which exhibited different reactions depending on the isolates. F1 hybrid 'ENSAT-R5 x AS613' showed significant negative SCA value for three out of four isolates (Table 3). The F1 hybrid coming from the cross between ENSAT-R5 and M6-54-1 which is a mutant line of AS613 has negative and significant SCA values for root but positive and significant ones for collar isolates.

The significant GCA and SCA effects indicated the importance of both additive and non-additive genetic components in controlling collar and root necrosis partial resistance to four different phoma isolates. However, for three out of four isolates the GCA/SCA ratios were more than one supporting the preponderance of additive gene effects in genetic control of collar and root necrosis severity. This is in agreement with a previous report from a factorial crosses that also indicated GCA is more important than SCA for phoma black stem response (Roustae et al., 2000a). The importance of GCA/SCA effects implies that the parents were highly influential on the performance of the progenies in determining resistance to the disease. Hence, conventional breeding methods can be recommended to achieve genetic improvement to these collar and root phoma isolates. In the case of TA4 isolate the ratio was less than one indicating the importance of non-additive gene effect for resistance. The existence of a great part of non-additive variance in the control of resistance shows the importance of F1 hybrid production for controlling the disease.

## References

- Abou Al Fadil T, Dechamp-Guillaume G, Poormohammad S K and Sarrafi A (2004) Genetic variability and heritability for resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Genetic and Breeding* 58: 323-328
- Bert P-F, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P and Vear F (2004) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 865-874
- Debaeke P, and Pérès A (2003) Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). *Crop protection* 22: 741-752
- Donald PA, Venette JR, and Gulya TJ (1987). Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Disease* 71: 466-468
- Griffing B (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Science* 9:463-493
- Gulya T, Rashid KY and Masirevic SM (1997) Sunflower disease: Phoma black stem. In: Schneiter, AA (Ed.), *Sunflower Technology and Production*. Agronomy Monograph no. 35. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, USA, pp 319-322
- Penaut A (1996) Phoma du tournesol : recherche des époques de contamination et mis au point de la protection fongicide. In: *Proceeding of the 14th International Sunflower Conference, Beijing, Chine. Shenyang, China: Academy of Agricultural Science* 2: 694-699
- Pérès A, Allard AM, Deverchère J, and Penaud A (1994) Phoma du tournesol: étude de la protection fongicide au champ. In: *Proceeding of the 4th International Conference on Plant Disease, AFPP, (pp. 1179-1185), Bordeaux, France*

- Pérès A, Poisson B and Drolon G (2000) Le syndrome 'pieds secs' du tournesol: étude des causes et approche de la nuisibilité. Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, ISA, Vol. 2 (pp.17-21), Toulouse, France,
- Poisson-Bammé B and Pérès A (2000) Survie du phoma du tournesol (*Leptosphaeria lindquistii*) sur les résidus de récolte. Proceeding of the Sixth International Conference on Plant Disease, AFPP (pp. 331-338), Tours, France
- Rachid Al-Chaarani G, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G and Sarrafi A (2002) A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). Theoretical and Applied Genetics 104: 490–496
- Roustae A, Barrault G, Dechamps-Guillaume G, Lesigne P and Sarrafi A (2000a) Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. Plant Pathology 49: 396–401
- Roustae A, Costes D, Dechamp-Guillaume G and Barrault G (2000b) Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. Plant Pathology 49: 227–234
- Sarrafi A, Kayyal H, Rachid Al-Chaarani G, Cantin F, Chaline AS and Durielle AS (2000) Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Heliantus annuus* L ). Journal of Genetic and Breeding 54: 227-231
- SAS Inst (2001) Statistical analysis system online documentation. Cary, NC
- Zhang Y and Kang MS (1997) DIALLEL-SAS: A SAS program for Griffing's diallel analyses. Agronomy Journal 89: 176-182

Table 1. Balanced completely randomized split plot analysis of variance for disease severity in sunflower genotypes infected by two collar and two root isolates of *Phoma macdonaldii*

Source of Variation	d.f. <sup>a</sup>	MS <sup>b</sup>	
		Collar	Root
Model	33	0.0914 <sup>***</sup>	10.4 <sup>***</sup>
Replication	2	0.004 <sup>*</sup>	0.007 <sup>ns</sup>
Isolate	1	0.001 <sup>ns</sup>	126.95 <sup>**</sup>
Isolate x Replication (E <sub>a</sub> )	2	0.002 <sup>ns</sup>	0.203 <sup>**</sup>
Genotype	14	0.172 <sup>***</sup>	6.40 <sup>***</sup>
Genotype x Isolate	14	0.043 <sup>***</sup>	9.04 <sup>***</sup>
Residual (E <sub>b</sub> )	56	0.0038	0.03

Coefficients of determination (R<sup>2</sup>) of the model are 0.94 and 0.99 for black collar and black root experiments respectively.

Coefficients of Variation (C.V.) are 8.58 and 3.81 percent for black collar and black root experiments respectively.

<sup>a</sup> d.f.=degrees of freedom

<sup>b</sup> MS= Mean of squares

\*, \*\* and \*\*\* = significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level respectively; n.s.= non significant

Table 2. Analysis of variance and combining abilities for disease severity in sunflower genotypes infected by two collars and two root isolates of *Phoma macdonaldii*

Source of Variation	d.f. <sup>a</sup>	MS <sup>b</sup>			
		Collar		Root	
		TA6	TA9	TA4	TA8
<i>Variance analysis:</i>					
Total	44	0.034	0.04	3.21	1.75
Block	2	0.003 <sup>ns</sup>	0.002 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	0.14 <sup>*</sup>
Genotype	14	0.093 <sup>***</sup>	0.122 <sup>***</sup>	10.01 <sup>***</sup>	5.43 <sup>***</sup>
Residual	28	0.006	0.002	0.03	0.03
<i>Diallel analysis:</i>					
GCA <sup>c</sup>	4	0.255 <sup>***</sup>	0.213 <sup>***</sup>	5.53 <sup>***</sup>	13.69 <sup>***</sup>
SCA <sup>d</sup>	10	0.029 <sup>***</sup>	0.085 <sup>***</sup>	11.80 <sup>***</sup>	2.13 <sup>***</sup>
Error	28	0.002	0.001	0.01	0.01
GCA/SCA		8.80	2.51	0.47	6.43
Coefficient of Variation		10.78	5.55	3.03	5.16

<sup>a</sup> d.f.=degrees of freedom.

<sup>b</sup> MS= Mean of squares

<sup>c</sup> GCA, general combining ability.

<sup>d</sup> SCA, specific combining ability.

\*, \*\* and \*\*\* = significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level respectively; n.s.= non significant

Table 3. Estimated general and specific combining ability effects and means for disease severity of 5 sunflower genotypes and their F1 hybrids infected by two black collar and two root necrosis isolates of *Phoma macdonaldii*

Genotype	Collar				Root			
	TA6		TA9		TA4		TA8	
<i>Parents:</i>	$\bar{X}$	GCA	$\bar{X}$	GCA	$\bar{X}$	GCA	$\bar{X}$	GCA
ENSAT-B5	2.9 <sup>bcd</sup>	-0.039 <sup>*</sup>	1.87 <sup>fg</sup>	-0.104 <sup>***</sup>	8.6 <sup>a</sup>	0.76 <sup>***</sup>	2.65 <sup>g</sup>	-0.09 <sup>*</sup>
ENSAT-R5	1.6 <sup>ef</sup>	-0.150 <sup>***</sup>	1.6 <sup>g</sup>	-0.100 <sup>***</sup>	5.8 <sup>d</sup>	-0.04 <sup>ns</sup>	6.45 <sup>a</sup>	1.34 <sup>***</sup>
B454/03	3.5 <sup>bcd</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	2.7 <sup>cde</sup>	-0.057 <sup>***</sup>	5.94 <sup>d</sup>	-0.17 <sup>***</sup>	1.35 <sup>i</sup>	-0.65 <sup>***</sup>
AS613	6.8 <sup>a</sup>	0.037 <sup>*</sup>	7.4 <sup>a</sup>	0.096 <sup>***</sup>	4.56 <sup>f</sup>	-0.66 <sup>***</sup>	2.2 <sup>h</sup>	-0.59 <sup>***</sup>
M6-54-1	7.3 <sup>a</sup>	0.152 <sup>***</sup>	6.7 <sup>a</sup>	0.119 <sup>***</sup>	7.25 <sup>c</sup>	0.09 <sup>*</sup>	2.85 <sup>fg</sup>	-0.19 <sup>***</sup>
LSD <sub>0.01</sub>	0.18	0.02	0.10	0.01	0.40	0.05	0.40	0.05
<i>F1 hybrids:</i>	$\bar{X}$	SCA	$\bar{X}$	SCA	$\bar{X}$	SCA	$\bar{X}$	SCA
ENSAT-B5 x ENSAT-R5	2.37 <sup>def</sup>	0.033 <sup>ns</sup>	2.47 <sup>def</sup>	0.052 <sup>*</sup>	7.85 <sup>b</sup>	1.55 <sup>***</sup>	4.15 <sup>c</sup>	-0.47 <sup>***</sup>
ENSAT-B5 x B454/03	2.6 <sup>cde</sup>	-0.077 <sup>ns</sup>	1.27 <sup>h</sup>	-0.232 <sup>***</sup>	3.4 <sup>i</sup>	-2.77 <sup>***</sup>	3.15 <sup>ef</sup>	0.52 <sup>***</sup>
ENSAT-B5 x AS613	2.7 <sup>cd</sup>	-0.060 <sup>ns</sup>	2.67 <sup>cde</sup>	-0.056 <sup>**</sup>	3.05 <sup>i</sup>	-2.62 <sup>***</sup>	3.85 <sup>d</sup>	1.16 <sup>***</sup>
ENSAT-B5 x M6-54-1	5.38 <sup>ab</sup>	0.025 <sup>ns</sup>	7.5 <sup>a</sup>	0.208 <sup>***</sup>	7.35 <sup>c</sup>	-0.93 <sup>***</sup>	3.3 <sup>e</sup>	0.21 <sup>*</sup>
ENSAT-R5 x B454/03	2.1 <sup>def</sup>	-0.020 <sup>ns</sup>	3.47 <sup>c</sup>	0.136 <sup>***</sup>	4.25 <sup>g</sup>	-1.12 <sup>***</sup>	5 <sup>b</sup>	1.12 <sup>***</sup>
ENSAT-R5 x AS613	1.47 <sup>f</sup>	-0.20 <sup>***</sup>	2.97 <sup>cd</sup>	-0.068 <sup>**</sup>	5.7 <sup>d</sup>	0.83 <sup>***</sup>	3.1 <sup>ef</sup>	-0.84 <sup>***</sup>
ENSAT-R5 x M6-54-1	5.2 <sup>ab</sup>	0.125 <sup>**</sup>	8.87 <sup>a</sup>	0.196 <sup>***</sup>	3.75 <sup>h</sup>	-1.87 <sup>***</sup>	3.38 <sup>e</sup>	-0.96 <sup>***</sup>
B454/03 x AS613	4 <sup>abc</sup>	0.020 <sup>ns</sup>	7.5 <sup>a</sup>	0.185 <sup>***</sup>	7.6 <sup>bc</sup>	2.86 <sup>***</sup>	1 <sup>j</sup>	-0.95 <sup>***</sup>
B454/03x M6-54-1	6.7 <sup>a</sup>	0.038 <sup>ns</sup>	2.1 <sup>ef</sup>	-0.205 <sup>***</sup>	5.1 <sup>e</sup>	-0.39 <sup>***</sup>	2.75 <sup>fg</sup>	0.40 <sup>***</sup>
AS613 x M6-54-1	6.67 <sup>a</sup>	0.099 <sup>ns</sup>	4.6 <sup>b</sup>	-0.273 <sup>***</sup>	3.35 <sup>i</sup>	-4.21 <sup>***</sup>	2.88 <sup>fg</sup>	1.41 <sup>***</sup>
LSD <sub>0.01</sub>	0.18	0.11	0.10	0.06	0.40	0.24	0.40	0.24

$\bar{X}$  = Mean disease severity score, <sup>a</sup>GCA= General combining ability, <sup>b</sup>SCA= Specific combining ability.

Means followed by the same letter are not significantly different (P=0.05) according to Student-Newman-Keuls (SNK) test.

\*, \*\* and \*\*\* = significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level respectively; n.s.= non significant



QTL mapping of partial resistance to Phoma collar and root necrosis in  
sunflower (*Helianthus annuus* L.)

**Taissir. Abou Al fadil , Seifollah . Poormohammad Kiani , Gregory. Dechamp-  
Guillaume , Laurent . Gentzbittel , Ahmad . Sarrafi**

*Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP-ENSAT, 18 chemin de Borde Rouge, BP  
32607, 31326 Castanet, FRANCE*

**Soumis à journal : Plant Science**

*Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi  
Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP-ENSAT, 18 chemin de  
Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet, FRANCE  
E-mail address : [Sarraf@ensat.fr](mailto:Sarrafi@ensat.fr)  
Tel: + 33 5 62193580  
Fax: + 33 5 62193581*

## Abstract

The aim of present research was to study the genetic control of partial resistance of sunflower to *Phoma macdonaldii* isolates on collar and root, and to identify genomic regions involved in partial resistance. The experiment was conducted using F9 recombinant inbred lines (RILs) and their two parental lines. The RILs population was developed through single-seed descent (SSD) from a cross between 'PAC2' and 'RHA266'. Parents showed contrasting response in their partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates on the basis of our preliminary studies. Several QTLs with moderate effects were identified for each *Phoma* collar and root necrosis isolates. Co-locations of QTLs were observed being due to involvement of the same genomic regions in partial resistance to different isolates on collar and root. Several QTLs were also detected to be specific for a given collar or root necrosis isolate, which could be of interest for marker-assisted selection for resistance to a given isolate as well as for selecting favorable alleles controlling different isolates.

**Key words:** *Phoma macdonaldii*, Collar, Root, Quantitative trait loci, *Helianthus annuus* L.

## 1.Introduction

*Phoma macdonaldii* [1] the causal agent of black stem of sunflower (*Helianthus annuus* L.) has been reported from United States, Australia and European countries as well as from Asia [2,3,4,5]. The disease has been spreading steadily since 1990, and the fungus is now a major component of the pathogenic complex on sunflower [6]. It causes premature ripening associated with yield losses of 10 to 30% [7], and also reduction in oil content and thousand seed weight [8]. The disease can also cause premature plant death [9].

*Phoma macdonaldii* can infect different tissues of sunflower. Generally it infects the lower leaves of the plant and the most notable symptom of infection is a dark lesion at the base of the petiole [10]. *Phoma* may also infect the collar and the root system of plants, resulting in a girdling lesion occurring at the soil level. This may result in stunted plants with thin stems, smaller heads, lighter and fewer seeds per head, blackened pith and frequently premature death [9]. Direct infection by contact with infected shallow or buried residues on the roots or at stem base results collar and root necrosis symptoms [11]. *Phoma* infects the plants through direct penetration or indirectly through wounds or plant structural openings such as lenticels and stomata [12]. To date, sunflower genotypes with different levels of resistance to this disease have been identified, but no fully resistant genotypes are available [13].

Estimation of genetic variation is useful to determine the breeding value of lines and choosing the appropriate procedure in breeding programs in order to develop resistant genotypes against *Phoma*. Genetic variability for partial resistance to black stem diseases of sunflower has been reported in both field and controlled conditions [6,13,14,15]. Roustaei *et al.* [15] showed that additive genetic effects, which is important in breeding programmes to predict breeding value and progeny performance of crosses, are significant for some of F1 hybrids used in their research

work. Additive genetic effects for partial resistance to Phoma black stem was also reported by Rachid Al-Chaarni et al. [14] and Bert *et al.* [16]. During the past two decades, DNA molecular markers have been used successfully to develop genetic maps in numerous plant species in order to detect loci controlling quantitative trait variations. Several genetic maps have been developed in sunflower, based on RFLP [17], AFLP [18] and microsatellites [19]. The genetic maps have been used for mapping of quantitative trait loci (QTL) for a wide range of characteristics such as somatic embryogenesis [18], photosynthesis and water status [20], seed oil content, developmental and agronomic traits [21,22]. Quantitative trait loci associated with disease resistance in sunflowers, has been also identified for resistance to; *Diaporthe helianthi* [23], *Sclerotinia sclerotiorum* [16,24], Phoma black stem [14,16], and downy mildew [14].

Previous studies for partial resistance in sunflower to Phoma black stem have been performed by infection of cotyledon petioles with Phoma spores. As far as we know partial resistance to collar and root necrosis have not been reported in the literature. The aim of present study was to study the genetic control of partial resistance to Phoma collar and root necrosis isolates and to identify genomic regions involved in resistance.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Plant material and *Phoma macdonaldii* isolates**

The experiment was conducted using 99 F9 recombinant inbred lines (RILs) and their two parental lines. The RILs population was developed through single-seed descent (SSD) from a cross between 'PAC2' and 'RHA266' which showed contrasting response in their partial resistance to Phoma isolates on the basis of our preliminary studies.

Sunflower collar fragments from ten different French geographical origins showing collar characteristic symptoms were surface-sterilized for 5 minutes in a sodium

hypochlorite solution (6 chlorometric degrees), washed three times (5 min) in sterile distilled water, and transferred to Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) (39 g l<sup>-1</sup>, pH 6) and incubated for 10 days at 25°C under alternating periods of illumination (12 h, 37  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Philips TLD 15 W 33 lamps) and darkness to induce sporulation. Monopycnospore isolates were prepared by serial dilutions [13] and cultured on PDA for further subculture. To allow mycelial growth, monopycnospore cultures were placed on V8 medium (Campbell Grocery Products Ltd; Agar 20 g l<sup>-1</sup>, V8 200 ml l<sup>-1</sup>, pH6) and incubated for 7 days at 25°C in the dark. The pathogenicity of isolates for fulfilling Koch's postulates was confirmed [25]. Conservation of isolates was done using the method described by Roustaei *et al.* [13]. Through 10 monopycnospore isolates coming from sunflower collar fragments of ten different regions in France, four isolates (two for collar and the two others for root) were selected on the base of our preliminary studies and used in this programme. 'TA4' and 'TA6' isolates were derived from samples collected from centre and 'TA9' and 'TA2' were derived from samples collected from west and southwest of France in 1997.

## **2.2. Collar inoculation**

The responses of 99 RILs and parental lines were evaluated in two separate experiments. In each experiment the plant materials were inoculated by one of the two selected isolates ('TA6' and 'TA9'). The experimental design was randomized complete block with three replications. Each replication consisted of 12 plantlets. Seeds were sterilized for 5 min in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees) and washed in sterile distilled water. Two rows of five seeds per genotype per replication were sown in plastic containers. The experiments were conducted in a controlled environment chamber (25  $\pm$  1°C day, 18  $\pm$  1°C night and a relative humidity of 75-80%). Light intensity was 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  with a 14 h photoperiod. A disc of agar medium with mycelium (6 mm diameter) was placed beside the collar of 12 days-old sunflower plantlets (first pair of leaves were developed). After

inoculation, each container was enclosed for 48 h using transparent cover to maintain a near-saturated humidity favorable for fungal inoculation. The development of lesions on the collar was evaluated on a 1-9 scale for the percentage of necrotic area seven days after inoculation, where: 1= 0-5%, 2=6-10%, 3= 11-20%, 4=21-30%, 5=31-40%, 6=41-60%, 7=61-80%; 8=81-99% and 9=100%, with necrosis spreading up the collar.

### ***2.3. Root inoculation***

Two other experiments were undertaken each with one of the Phoma isolates selected for root inoculation ('TA2' and 'TA4'). 83 RILs and their parents were used with the same experimental design as explained for collar inoculation. Seeds were sown in Magenta boxes (one plantlet per box) containing Murashige and Skoog medium (4.4 g l<sup>-1</sup>), gelified by 2.8 gl<sup>-1</sup> Phytigel (Sigma). Experiments were realised in growth chamber (26 ± 1°C days, 19 ± 1°C night) with 75-80% relative humidity and 14 h photoperiod with 200µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> light intensity provided by NAV-T 600W lamps Osram-Vialox, Molsheim, France. Twelve-days-old plantlets were inoculated by 5µl of a pycniospore suspension (10<sup>6</sup> pycniospores per ml of water containing 0.25% gelatin) added to the medium near the root using a syringe. The development of symptom was scored on a 1-9 scale for the length of necrotic area seven days after inoculation, where: 1 = 0-0.5cm, 2 = 0.6-1cm, 3 = 1.1-1.6cm, 4 = 1.7-2.2cm, 5 = 2.3-2.8cm, 6 = 2.9-3.4cm, 7 = 3.5-4cm, 8 = 4.1-4.6cm, 9 = more than 4.7 cm necrosis area on the roots.

### ***2.4. Data analysis and QTL mapping***

Analysis of variance was carried out with SAS package in order to determine the effect of genotype, isolates and their interaction on partial resistance to the diseases. The Newman-Keuls test was used for comparing the means of parents and RILs. The mean of RILs and that of the parents was also compared. The most-resistant RIL to each isolate (lowest value) was compared with the resistant parent, and genetic gain

when the best RIL and 10% of the selected RILs were compared to the best parent and mean of their parents respectively was determined. Additive, environmental variances as well as narrow-sense heritability were calculated according to Kearsey and Pooni [26] using least-square estimates of genetic parameters.

The linkage map used in this study is the improved map presented recently by Poormohammad Kiani *et al.* [27]. In summary, using a set of 123 RILs and their parents, 'PAC2' and 'RHA266', a linkage map was constructed based on 197 simple sequence repeat (SSR) and 331 amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers.

QTLs mapping of the studied traits were performed by composite interval mapping (CIM), using QTL Cartographer, version 1.16 [28]. This model integrated two parameters for CIM: the number of markers which control the genetic background ( $nm=15$ ) and a window size ( $w=15$ ) that will block out a region of the genome on either side of the markers flanking the test site. The inclusion of background markers makes the analysis more sensitive to the presence of a QTL in the target interval. At each interval the significance of the association is tested by the likelihood-ratio statistic [29].

### 3. Results

Analysis of variance for RILs and their parents 'PAC2' and 'RHA266' showed highly significant differences among RILs for partial resistance to all *Phoma macdonaldii* isolates (Table 1). Significant differences were also observed between isolates. Interaction between RILs and isolates were also significant indicating different response of RILs when inoculated by different isolates. Genetic gain and heritability for partial resistance to *Phoma* isolates are presented in Table 2. Significant differences were observed between parents 'PAC2' and 'RHA266' for resistance to all four isolates. Parental lines showed a contrast level of partial resistance to different isolates. 'PAC2' presented significant higher level of partial resistance to 'TA6' and 'TA4' isolates. By contrast 'RHA266' showed a significant higher partial resistance to

'TA9' and 'TA2' isolates. Differences between mean of recombinant inbred lines ( $\bar{X}$  RIL) and mean of parents ( $\bar{X}$  P) were significant for 'TA6' but were not significant for other isolates. In the latter cases the RILs used in our study are representative of possible combinations of the cross 'PAC2'  $\times$  'RHA266' for partial resistance to Phoma isolates. Comparison between the best parent (BP) and the best RIL (BRIL) showed a significant difference for resistance to 'TA6', 'TA9' and 'TA2'. However, the difference was not significant for resistance to 'TA4' isolate. Significant differences were also observed when the mean of parents ( $\bar{X}$  P) was compared with the mean of 10% selected RILs (10%SRIL) for partial resistance to all collar and root necrosis isolates.

The QTLs associated with resistance to different Phoma isolates were identified and the most important ones are presented in Table 3. QTLs were designated as 'pcn' and 'prn' (phoma collar necrosis and phoma root necrosis respectively) followed by the isolate name, linkage group and QTL number respectively. Significant peak values of LOD scores, the position of their peaks, the percentage of phenotypic variance explained and the estimate of QTL effects based on a composite interval-mapping are also summarized in table 3.

The most important QTLs involved in resistance to 'TA6' isolate are located on linkage groups I, II, V, VII, X and XV and those for resistance to 'TA9' are located on linkage groups I, II, XII, XIII and XVII. As far as Phoma root necrosis is concerned, QTLs involved in resistance to 'TA2' are located on linkage groups V, VI, XII, XIII, XV and XVI and those of resistance to 'TA4' are located on linkage groups III, V, X, XV and XVII. The effects of each QTL ( $R^2$ ) for all four isolates were moderate, ranging from 10% to 30%, but a high percentage of phenotypic variance ( $TR^2$ ) is explained for partial resistance to both isolates when all the covariants are considered (71% to 94 %).



## 4. Discussion

The RILs studied in our experiment presented high genetic variation for partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates symptoms on collar and root. Genetic variability for partial resistance to Phoma black stem has been previously reported in both field and controlled condition [14,15]. Interaction between isolates and RILs for partial resistance to Phoma collar and root necrosis indicated that different genes or genomic regions might be involved in the resistance to each isolate. Significant differences between the best RIL (BRIL) and the best parent (BP), which occurs for quantitative traits, might be due to the polygenic nature of resistance to the disease and transgressive segregation of resistance genes. When the alleles increasing and decreasing the quantitative trait are dispersed in the parental lines, the accumulation of favorable alleles in progenies may result in the progenies with better values compared with the parental lines. Transgressive segregation has previously been reported by Rachid Al-Chaarani *et al.* [14,21] for partial resistance to black stem and downy mildew.

Narrow-sense heritability for partial resistance to different isolates on collar and root were from 0.44-0.48, which is close to 0.58 presented by Rachid Al-Chaarani *et al.* [14]. Bert *et al.* [16] reported a Broad-sense heritability of 0.94 for Phoma black stem resistance in sunflower.

Regarding the position of QTLs involved in resistance to 'TA6' and 'TA9' isolates, two QTLs for each isolate are located on linkage group I ('pcnTA6.1.1' and 'pcnTA9.1.1') and linkage group II ('pcnTA6.2.1' and 'pcnTA9.2.1') in different position and the latter are close together (Fig 1). It shows that genomic regions controlling resistance to different isolates on collar may be close together on the same linkage group. Alleles having positive effects for resistance to 'TA6' and 'TA9' come from both parents as the sign of the additive effect indicates which parent increases the trait value. It results in RILs with more extreme values than the parents, which is explained by transgressive segregation. High genetic gain (Table 2) observed for

partial resistance to different isolates on collar could be explained by RILs having QTLs with positive alleles from two parents.

Comparison of the positions of QTLs involved in resistance to Phoma isolates on root necrosis revealed the co-location of two QTLs for isolate 'TA2' ('prnTA2.5.1' and 'prnTA4.5.1') and for isolate 'TA4' ('prnTA2.15.1' and 'prnTA4.15.1') on linkage groups V and XV; the latter being in the same position (Fig 1). The alleles having positive effects for partial resistance to 'TA2' isolate come from both parents whereas in the case of QTLs detected for partial resistance to 'TA4', the alleles having positive effects come from 'RHA266'. It seems that 'RHA266' contributed in resistance to 'TA4' more than PAC2 (Table 2). Using the RILs from the same cross with another isolate (MP6), Rachid Al-Chaarani *et al.* [14] detected seven QTLs for resistance to Phoma black stem also with moderate effect ranging from 6% to 17%. Using an RFLP/AFLP map of F3 families, Bert *et al.* [16] reported four QTLs for resistance of sunflower to black stem. However the lack of SSR markers and the same AFLP nomenclature in their maps makes it difficult to compare the location of QTLs detected in our study and those detected by them. In sunflower, QTLs for resistance to *S. sclerotiorum* [24] and candidate genes for downy mildew [17,30] have been also identified.

A comparison between QTLs involved in resistance to Phoma isolates on collar and root showed co-location of QTLs across two tissues. A QTL detected for resistance to collar necrosis isolate 'TA6' (pcnTA6.5.1) and root necrosis isolate 'TA2' (prnTA2.5.1) are co-located on the same linkage group (V) in the same position (95.45 cM from north of linkage group V). The alleles having positive effects for both QTLs come from RHA266. Co-location of QTLs was also observed for resistances to collar 'TA9' isolate and resistances to root 'TA2' isolate on linkage group XII in the same position ('pcnTA9.12.1' and 'prnTA2.12.1'). Interestingly the alleles having positive effects on 'pcnTA9.12.1' come from 'PAC2' whereas the alleles having positive effect on 'prnTA2.12.1' come from 'RHA266'. QTLs were also detected across two tissues, co-located on the same linkage group (XIII) in the same or different position (Fig 1). Co-

locations of QTLs, indicate the involvement of the same genomic regions in resistance to different isolates on collar and root. The term non-specific QTLs (general) can be referred to these co-located QTLs which could be important in general defense mechanisms. Several QTLs were also detected to be specific for a given isolate (specific QTLs), which could be of interest for marker-assisted selection for resistance to a given isolate as well as for selecting favorable alleles for different isolates which should be accumulated in a genotype. Example of specific QTLs are: 'pcnTA6.7.1', 'pcnTA6.10.1' and 'pcnTA9.1.1' for collar isolates as well as 'prnTA2.16.1' and 'prnTA4.3.1' for root isolates. Different QTLs detected for resistance to isolates may be due to various mechanisms involved in resistance to each fungal isolates. Regarding general- and specific-QTLs detected for different Phoma isolates on collar and root, we suggest that both specific and non-specific genes or genomic regions control partial resistance to studied Phoma isolates. Isaac [12] suggested that each species of fungal pathogen might display different modes of penetration under different conditions. As breeding sunflower to Phoma black stem is complicated by the fact that pathogen can attack several parts of the plant and the level of resistance may be different for each part [31]. The QTLs identified in this study could be usefully combined in order to transfer favorable alleles into high yielding sunflower elite lines by marker-assisted selection.

## References

- [1] W.C. McDonald, Phoma black stem of sunflower, *Phytopathology*. 54 (1964) 492-493
- [2] M. Acimovic, Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia, 1981-1983, *Helia*. 7 (1984) 45-54.
- [3] Z. Hua, G. Ma, A review of sunflower disease research in China. In : Proc. 14th International Sunflower Conference. Beijing, China, International Sunflower association, Paris, France, 1996, pp. 754-759.
- [4] M. Siddique-Mirza, A.R Masood, M. Ayub, Sunflower diseases in Pakistan in the period 1980 to 1987. In: Proc. 12th International Sunflower Conference. Novi-Sad, Yugoslavia, International Sunflower Association, Paris, France ,1988, pp. 2-25.
- [5] S. Madjidieh-Ghassemi, Studies on some important fungal diseases of sunflower in Iran. In: Proc. 12th International Sunflower Conference, Novi-Sad, Yugoslavia, International Sunflower Association, Paris, France, 1988, pp. 22-23.
- [6] A. Peres, C. Lefol, *Phoma macdonaldii* Boerema: Eléments de biologie et mise au point d'une méthode de contamination artificielle en conditions contrôlées. In : Proc. 14th International Sunflower Conference. Beijing, China, International Sunflower association, Paris, France, 1996, pp. 687-693.
- [7] A. Penaud, Phoma du tournesol: Recherche des époques de contamination et mise au point de la protection fongicide. In: Proc. 14th International Sunflower Conference. Beijing, China, International Sunflower association, Paris, France, 1996, pp. 694-699.
- [8] M. L. Carson, Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower, *Plant Dis*. 75 (1991) 1150-1153.

- [9] P.A. Donald, J.R. Venette, T.J.Gulya, Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower, *Plant Dis.* 71 (1987) 466-468.
- [10] A. Peres, A.M. Allard, J. Deverchere, A. Penaud, *Phoma* du tournesol: etude de la protection fongicide au champ. In: 4<sup>ème</sup> Conference Internationale Sur les Maladies Des Plantes, Bordeaux, France. Paris, France: Association Nationale de Protection des Plantes, 1994, pp. 1179-1185.
- [11] B. Poisson-Bammé, A. Pérès, Survie du phoma du tournesol (*Leptosphaeria lindquistii*) sur les résidus de récolte. Proceeding of the Sixth International Conference on Plant Disease, Tours, France, 2000 pp. 331-338.
- [12] S. Isaac, *Fungal-Plant Interactions*, Chapman and Hall, London, 1992.
- [13] A. Roustaee, G. Barrault, G. Dechamp-Guillaume, P. Lesigne, A. Sarrafi, Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii* L.) in sunflower. *Plant Pathol.* 49 (2000) 396-401.
- [14] G. Rachid Al-Chaarani, A. Roustaee, L. Gentzbittel, L. Mokrani, G. Barrault, G. Dechamp-Guillaume, A. Sarrafi, A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines , *Theor Appl Genet.* 104 (2002) 490–496.
- [15] A. Roustaee, S. Costes, G. Dechamp-Guillaume, G. Barrault Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph: *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower, *Plant Pathol.* 49 (2000) 227-234.
- [16] P. F. Bert, G. Dechamp-Guillaume, F. Serre, I. Jouan, D.Tourvielle de Labrouhe, P. Nicolas, F. Vear, Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*, *Theor Appl Genet.* 109 (2004) 865-874.

- [17] L. Gentzbittel, F. Vear, Y.X. Zhang, A. Berville, Nicolas. P, Development of a consensus RFLP linkage map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theor Appl Genet.* 90 (1995) 1079–1086.
- [18] E. Flores Berrios, L. Gentzbittel, H. Kayyal, G. Alibert, A. Sarrafi, AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theor Appl Genet.* 101 (2000) 1299–1306.
- [19] S. Tang, J.K. Yu, M.B. Slabaugh, D.K. Shintani, S.J. Knapp, Simple sequence repeat map of the sunflower genome, *Theor Appl Genet.* 105 (2002) 1124–1136.
- [20] D. Hervé, F. Fabre, E. Flores Berrios, N. Leroux, G. Al charani, C. Planchon, A. Sarrafi, L. Gentzbittel, QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under green house condition, *J Exp Bot.* 362 (2001) 1857-1864.
- [21] G. Al-Chaarani, L. Gentzbittel, X. Huang, A. Sarrafi, Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits using AFLP and SSR in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theor Appl Genet.* 109 (2004) 1353-1360.
- [22] L. Mokrani, L. Gentzbittel, F. Azanza, L. Fitamant, G. Al-Chaarani, A. Sarrafi Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theor Appl Genet.* 106 (2002) 149–156.
- [23] P.F. Bert, I. Jouan, D. Tourvielle de Labrouhe D, F. Serre, P. Nicolas, F. Vear, Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*, *Theor Appl Genet.* 105(2002) 985–993.
- [24] E. Mestries, L. Gentzbittel, D. Tourvieille de Labrouhe, P. Nicolas, F. Vear, Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia*

- sclerotiorum in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers, *Mol Breed.* 4 (1998)215–226.
- [25] D.L. Hawksworth, P.M. Kirk, B.C. Sutton, D.N. Pegler, Ainsworth and Bioby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Surrey, UK, 1995
- [26] M.J. Kearsey and H.S. Pooni, The genetical analysis of quantitative traits, Chapman and Hall. London, UK, 1996.
- [27] S. Poormohammad Kiani, P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R . Heinz, A . Perrault, V. Nishinakamasu, E . Hopp, N. Paniego, L . Gentzbittel, A . Sarrafi, Development of a new AFLP and SSR genetic linkage map and identification of QTLs for photosynthesis related traits under well-watered and water-stressed conditions in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Theor Appl Genet* (2006) submitted.
- [28] C.J. Basten, B.S. Weir, Z.B. Zeng, QTL cartographer version 1.16: Program in Statistical Genetics, Department of Statistics, North Carolina State University, USA 2002.
- [29] C.S. Haley, S.A. Knott, A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers, *Heredity* 69 (1992) 315–324.
- [30] F. Vear, L. Gentzbittel, J. Philippon, S. Mouzeyar, E. Mestries, P. Roeckel-Drenet, D. Tourvieille de Labrouhe, P. Nicolas, The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theor Appl Genet* 95 (1997) 584–589.
- [31] F. Castaño, M.C. Hémerly-Tardin, D. Tourvieille de Labrouhe, F. Vear, The inheritance and biochemistry of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* leaf infections in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Euphytica* 58 (1992) 209–219.

Table 1. Mean square for disease severity in sunflower recombinant inbred lines (RILs) and two parents inoculated by *Phoma macdonaldii* isolates on collar and root.

Source of variation	Collar		Root	
	<i>d.f.</i> <sup>a</sup>	MS <sup>b</sup>	<i>d.f.</i>	MS
Total	593	3.57	497	3.33
Block	2	0.98 <sup>*</sup>	2	0.61 <sup>ns</sup>
RIL	98	10.10 <sup>***</sup>	82	9.83 <sup>***</sup>
Isolate	1	5.03 <sup>***</sup>	1	122.50 <sup>***</sup>
RIL*Isolate	98	10.56 <sup>***</sup>	82	7.55 <sup>***</sup>
Residual	394	0.21	330	0.32
CV% <sup>c</sup>	8.62		12.23	

<sup>a</sup> *d.f.*=degrees of freedom

<sup>b</sup> MS= mean of squares

<sup>c</sup> CV=coefficient of variation

\*,\*\*\* and ns: significant at 0.05, 0.001 levels and non significant



Table 2. Genetic gain and heritability for resistance to *Phoma macdonaldii* isolates on collar and root in sunflower recombinant inbred lines (RILs).

Parameter	Collar		Root	
	‘TA6’	‘TA9’	‘TA2’	‘TA4’
‘PAC2’ (P1)	1.92	7.69	6.67	2.66
‘RHA266’ (P2)	5.76	4.48	3.00	7.00
P1-P2	-3.48**	3.21**	3.67**	-4.44**
$\bar{X}_P = (P1+P2)/2$	3.84	6.08	4.83	4.33
$\bar{X}_{RIL}$	5.28	5.46	4.16	5.16
$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	1.44**	-0.62 <sup>ns</sup>	-0.67 <sup>ns</sup>	0.83 <sup>ns</sup>
B RIL	1.26	1.80	2.00	2.10
GGB= BRIL - BP	-0.66**	-2.68**	-1.00**	-0.56 <sup>ns</sup>
10%SRILs	1.47	2.13	2.12	2.20
GG10%=10%SRIL- $\bar{X}_P$	-2.37**	-3.95**	-2.71**	-2.13**
LSD <sub>0.05</sub>	0.51	0.92	0.67	1.09
h <sup>2</sup>	0.48	0.46	0.46	0.44

‘PAC2’ (P1) and ‘RHA266’ (P2): parental lines

$\bar{X}_P$ : mean of two parental lines

$\bar{X}_{RIL}$ : mean of all recombinant inbred lines (RILs)

BRIL: the best RIL

BP: the best parent

10%SRILs: 10% Selected RILs

GGB: genetic gain when the best RIL is compared with the best parent

GG10%: genetic gain when the mean of 10% selected RILs are compared with the mean of parents

LSD<sub>0.05</sub>: least significant differences calculated using  $t_{0.05}$  and error mean square of each trait

\*\* and ns: significant at 0.01 level and non significant

h<sup>2</sup>: Narrow-sense heritability

Table 3. Map positions and effects of QTLs detected for resistance to *Phoma macdonaldii* isolates on collar and root in sunflower recombinant inbred lines (RILs).

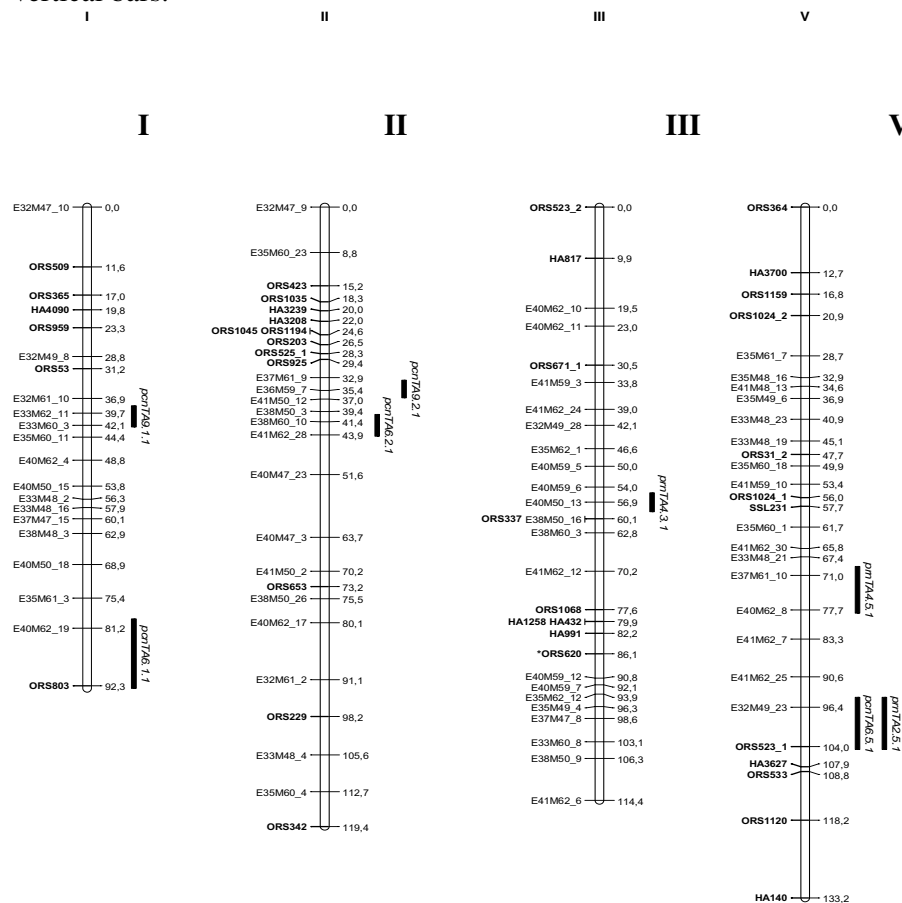
QTL	Linkage group	Marker	Position (cM) <sup>a</sup>	LOD	Additive effect	R <sup>2</sup> <sup>b</sup>	TR <sup>2c</sup>
Collar							
<b>‘TA6’</b>							
<i>pcnTA6.1.1</i>	I	20	80.40	5.40	-0.61	0.10	0.84
<i>pcnTA6.2.1</i>	II	16	41.02	6.27	0.76	0.15	0.89
<i>pcnTA6.5.1</i>	V	23	95.45	7.93	-0.80	0.16	0.85
<i>pcnTA6.7.1</i>	VII	20	63.85	8.02	-0.68	0.12	0.82
<i>pcnTA6.10.1</i>	X	3	6.70	6.88	0.96	0.16	0.89
<i>pcnTA6.10.2</i>	X	11	39.12	7.72	1.03	0.16	0.84
<i>pcnTA6.15.1</i>	XV	9	26.16	5.83	-0.69	0.13	0.86
<b>‘TA9’</b>							
<i>pcnTA9.1.1</i>	I	9	39.34	5.04	-1.07	0.26	0.89
<i>pcnTA9.2.1</i>	II	13	35.40	6.22	0.7571	0.13	0.73
<i>pcnTA9.12.1</i>	XII	15	56.94	11.32	1.1927	0.30	0.81
<i>pcnTA9.13.1</i>	XIII	6	24.66	5.91	0.9518	0.22	0.90
<i>pcnTA9.17.1</i>	XVII	11	49.80	7.14	-0.9376	0.15	0.71
Root							
<b>‘TA2’</b>							
<i>prnTA2.5.1</i>	V	23	95.45	8.53	-0.5297	0.21	0.93
<i>prnTA2.6.1</i>	VI	16	73.52	7.41	-0.5591	0.25	0.94
<i>prnTA2.12.1</i>	XII	15	56.95	12.37	-0.4927	0.24	0.84
<i>prnTA2.13.1</i>	XIII	6	24.73	6.13	0.487	0.21	0.93
<i>prnTA2.15.1</i>	XV	18	72.58	5.44	-0.6082	0.18	0.86
<i>prnTA2.16.1</i>	XVI	4	23.43	5.69	0.4776	0.18	0.92
<b>‘TA4’</b>							
<i>prnTA4.3.1</i>	III	11	57.11	5.49	-0.5387	0.21	0.94
<i>prnTA4.5.1</i>	V	19	70.34	5.37	-0.6163	0.25	0.92
<i>prnTA4.10.1</i>	X	69	209.50	6.74	-0.5847	0.23	0.93
<i>prnTA4.15.1</i>	XV	19	75.15	6.50	-0.5736	0.12	0.77
<i>prnTA4.17.1</i>	XVII	4	20.53	5.49	0.5669	0.22	0.92

<sup>a</sup> From the north of linkage group

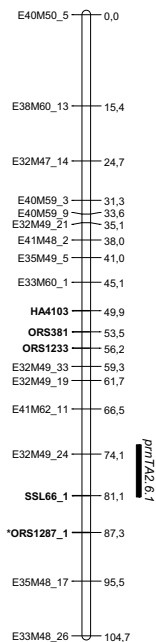
<sup>b</sup> Percentage of phenotypic variance explained by each QTL (QTL Cartographer, version 1.16, Basten et al. [27])

<sup>c</sup> Percentage of phenotypic variance explained by the QTLs given all the covariants (QTL cartographer, version 1.16, Basten et al. [27])

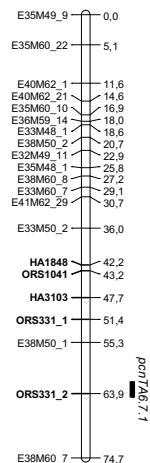
Fig 1. Genetic linkage map of sunflower genome based on a cross between ‘PAC2’× ‘RHA266’. Only the linkage groups including QTLs are presented. Linkage groups are those defined by Poormohammad Kiani et al. [27] and the positions of QTLs are presented by vertical bars.



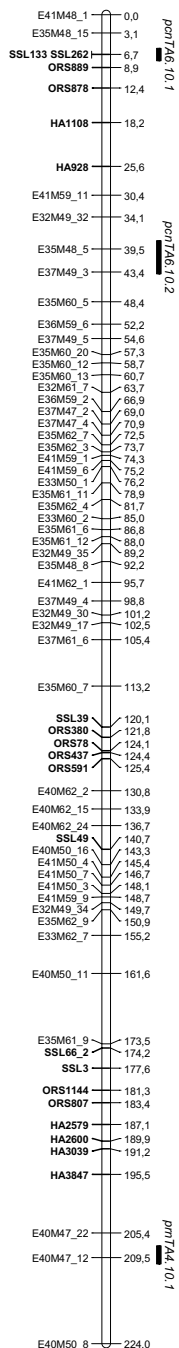
# VI



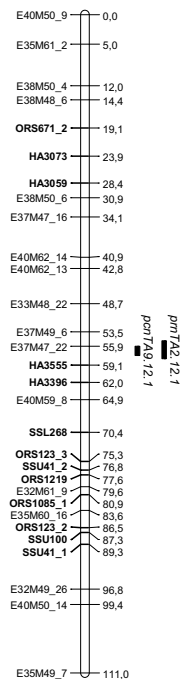
# VII



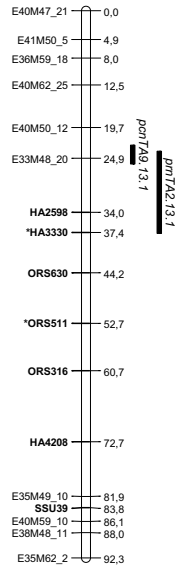
# X



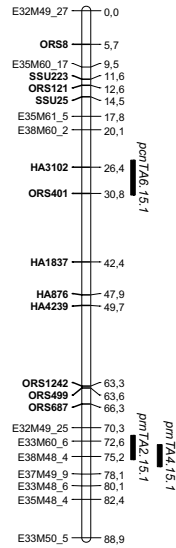
# XII



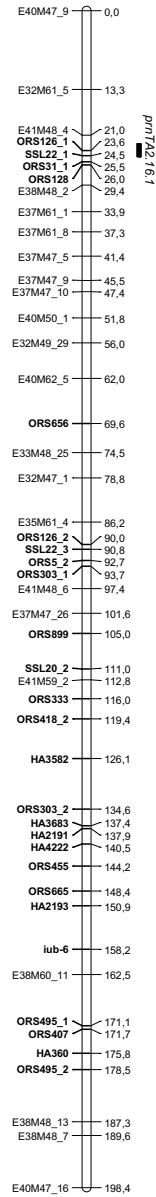
### XIII



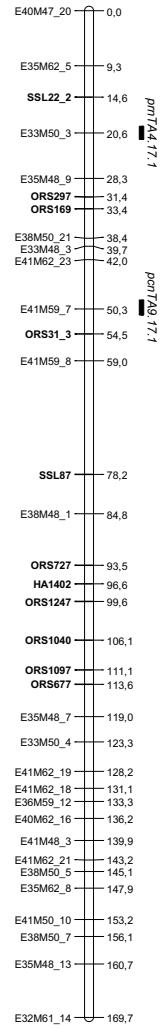
### XV



### XVI



### XVII



## Discussion

Des familles F3 partiellement résistants identifiés dans notre première étude (variabilité génétique de la résistance au *Phoma* chez le tournesol) laissent à penser qu'il existerait un grand nombre de gènes directement ou indirectement impliqués dans la résistance au *Phoma*. Cela a déjà d'ailleurs été démontré chez *Arabidopsis thaliana* (Sharpino, 2000). A notre connaissance, aucun mutant de tournesol résistant à la maladie des taches noires n'a été décrit dans la littérature. En revanche, un mutant résistant à la rouille, a été identifié (Lofgren and Rama Raje Urs, 1982). Chez d'autres espèces, un certain nombre de résistances aux maladies ont été obtenues suite à un traitement mutagène et incorporé dans les cultivars commerciaux. Cela est le cas pour la résistance au *Fusarium* chez la tomate (Evans, 1989), au mildiou chez l'orge (Jorgensen, 1992), aux rouilles chez le blé (Boyd *et al.*, 2002) et à « eyesot » chez la canne à sucre (Evans, 1989).

Les familles F3 proviennent du croisement entre un mutant partiellement résistant et la variété originelle sensible (AS-613) présentent une forte variabilité pour la résistance partielle à la maladie des taches noires, allant de très sensible (8.6) à une résistance relative (4.1) (article 1). Les familles F3 présentant une résistance relative pourraient être utilisées dans un programme de sélection visant à améliorer la résistance au *Phoma macdonaldii*. Nos résultats confirment également la nature polygénique de ce caractère, et permet d'envisager l'accumulation d'allèles favorables dans certaines familles F3. Roustae *et al.* (2000a) ont montré que plusieurs gènes à effets additifs et dominants contrôlaient la résistance au *Phoma* chez le tournesol. Dans notre travail, l'héritabilité de la résistance à la maladie des taches noires est de 69.5%, proche de celle de 66.4% décrite par (Roustae *et al.* 2000a). Les familles F3 sélectionnées, montrant une résistance relative à *Phoma macdonaldii* sont auto fécondées chaque année, et les lignées fixées résistantes issues de ce programme pourront être utilisées dans les schémas de sélection.

Les résultats de notre étude diallèle (deuxième article) confirment la variabilité génétique de la résistance partielle à la nécrose du collet et des racines causée par *Phoma macdonaldii* chez le tournesol qui avait déjà été reportée après expérimentations en champs et en conditions contrôlées (Péres *et al.* , 1994).

Les effets significatifs de l'aptitude générale à la combinaison (AGC) et l'aptitude spécifique à la combinaison (ASC) montrent l'importance des composants génétiques additifs et non additifs qui contrôlent la résistance partielle aux isolats du phoma du collet et de la racine. Cependant, pour trois des quatre isolats de *Phoma macdonaldii*, les ratios AGC / ASC sont supérieurs à 1, indiquant la prépondérance des effets additifs dans le contrôle génétique de la sévérité des symptômes de nécroses au collet ou racinaires. Ceci est en accord avec des travaux précédents où l'AGC était plus importante que l'ASC (Roustae *et al.*, 2000a).

L'importance de (AGC) et (ASC) implique que les parents ont une influence importante sur les performances des lignées filles déterminant la réponse à la maladie. Ainsi, les méthodes de sélection classiques peuvent être recommandées afin d'améliorer génétiquement la résistance partielle au phoma du collet ou de la racine. Dans le cas de l'isolat TA4, le ratio AGC / ASC est inférieur à 1, montrant l'importance des effets génétiques non additifs. L'existence d'une grande part de variance non additive dans le contrôle de la résistance montre l'importance de la production d'hybrides F1 afin de contrôler la maladie causée par les différents isolats. Les RILs utilisées dans notre étude d'identification des QTLs de la résistance au *phoma macdonaldii*, ont présentée une importante variation génétique pour la résistance partielle au phoma du collet et au phoma racinaire. La variabilité génétique du tournesol pour la résistance au phoma a déjà été décrite tant au champ qu'en conditions contrôlées. L'interaction entre isolats de *Phoma macdonaldii* et les RILS montrent qu'il peut exister des gènes ou des régions génomiques différentes impliquées dans la résistance de génotypes de tournesol à des isolats bien spécifiques de phoma. Des différences significatives entre les RILS les plus performantes (10%

des RILs) sélectionnés et le meilleur parent pourraient être dues à la nature polygénique de la résistance à la maladie et à la ségrégation transgressive des gènes de résistance. Lorsque les allèles augmentant ou diminuant le caractère quantitatif sont dispersés dans les lignées parentales, l'accumulation d'allèles favorables dans la descendance peut générer des lignées plus performantes que les parents. La ségrégation transgressive a déjà été décrite par Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002) et Rachid Al-Chaarani *et al.* (2004) dans le cas de la résistance partielle du tournesol au phoma et au mildiou.

L'héritabilité au sens propre pour la résistance partielle à différents isolats sur racine ou sur collet est comprise entre 0.44 et 0.48, valeur proche (0.58) de celle trouvée par Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002). Bert *et al.* (2004), ont rapporté une héritabilité au sens large de 0.94 pour la résistance du tournesol à *Phoma macdonaldii*. En ce qui concerne la position des QTL impliqués dans la résistance aux isolats TA6 et TA9, deux sont localisés sur le groupe de liaison 1 ('*pcnTA6.1.1*' et '*pcnTA9.1.1*') et le groupe de liaison 2 ('*pcnTA6.2.1*' et '*pcnTA9.2.1*') en positions différentes, mais cependant proches. Cela montre que des régions génomiques contrôlant la résistance à différents isolats du collet peuvent être proches sur le même groupe de liaison. Les allèles ayant un effet positif sur la résistance à TA6 et TA9 proviennent des deux parents comme cela est indiqué par le signe de l'effet additif. Cela résulte en des lignées à des valeurs plus importantes que celles des parents, phénomène expliqué par la ségrégation transgressive. Le gain génétique observé chez certaines RILs correspond à des lignées ayant hérité d'allèles positives issues des deux parents. La comparaison des positions des QTLs impliqués dans la résistance au phoma racinaire ou au phoma du collet a montré la co-localisation de deux QTLs pour le groupe de liaison 5 (TA2 et TA6) et pour le groupe de liaison 15 (TA2 et TA4). Les allèles ayant des effets positifs pour la résistance partielle à TA2 proviennent des deux parents alors que dans le cas du QTL détecté pour la résistance partielle à TA4, les allèles positifs proviennent uniquement de RHA 266. Il semblerait que RHA 266 contribue de manière plus conséquente à la résistance à TA4 que PAC2 en utilisant



ces mêmes RILs contaminées par un isolat de *Phoma macdonaldii* différents (MP6), Rachid Alnchaarani *et al.* (2002) détectèrent 7 QTLs impliqués dans la résistance du tournesol à *phoma macdonaldii*, dont l'effet est modéré allant de 6 à 17%. Par l'utilisation d'une carte RFLP/AFLP de familles F3, (Bert *et al* 2004) ont rapporté l'existence de 4 QTL. Cependant, l'absence de marqueurs SSR et la nomenclature AFLP utilisée rendent la comparaison de la localisation des QTLs difficile. Des QTLs expliquant la résistance à *S. Sclerotiorum* et des gènes de résistance candidats au mildiou ont également été identifiés (Mestries *et al.* 1998).

La comparaison des QTL impliqués dans la résistance aux isolats de phoma du collet et au phoma racinaires montre une colocalisation. Un QTL détectée pour la résistance à la nécrose du collet causée par l'isolat TA6 et un autre pour la résistance à la nécrose racinaire due à l'isolat TA2 sont colocalisé sur, le groupe de liaison 5, et à la même position (95.45 cM depuis le nord du groupe de liaison). Les allèles ayant un effet positif pour les deux QTLs proviennent du génotype RHA266. Une colocalisation a également été observée pour la resistance au phoma du collet due à TA9 et pour la résistance au phoma racinaire causé par TA2 sur le groupe de liaison 12, ('*pcnTA9.12.1*' et '*prnTA2.12.1*'). De manière intéressante, les allèles ayant un effet positif sur '*pcnTA9.12.1*' proviennent de PAC2 alors que ceux ayant un effet positif sur '*prnTA2.12.1*' proviennent de RHA266. Des QTLs ont également été détectés pour différent tissus sur le même groupe de liaison (12) à la même position, ou en des positions différentes. La colocalisation de QTLs indique l'implication de la même région génomique dans la résistance à différents isolats provoquant une nécrose du collet ou de la racine. Le terme QTL non spécifique fait référence à des QTLs qui pourraient être importants dans les mécanismes généraux de défense vis-à-vis de *phoma macdonaldii*. Certains QTLs sont spécifiques car interviennent dans les mécanismes de défense vis-à-vis de certains isolats. Ces QTLs pourraient être intéressants dans les programmes de sélection afin d'introgresser le caractère permettant la tolérance à un isolat donné ou pour accumuler les allèles favorables pour différents isolats au sein d'un seul et même génotype. Les exemples de QTLs

spécifiques sont *pcnTA6.7.1'*, '*pcnTA6.10.1'* et '*pcnTA9.1.1'* pour les isolats du collet, ainsi que *prn.TA2.16.1* et '*prnTA4.3.1'* pour les isolats induisant la nécrose racinaire. Les QTL détectés dans le mécanisme de résistance aux isolats peuvent être impliqués dans des processus spécifiques de résistance à des isolats donnés. Isaac, (1992) a montré que chaque espèce de pathogène fongique peut mettre en œuvre des modes de pénétration différents, qui vont en outre varier suivant les conditions extérieures. L'amélioration du tournesol pour la résistance au phoma est rendue compliquée du fait que ce pathogène peut attaquer différentes parties de la plante, et le niveau de résistance peut varier des organes à l'autre. Les QTLs identifiés au cours de notre étude pourraient être utilisés en combinaison les uns avec les autres afin de créer, par des méthodes de sélection assistées par marqueurs des variétés élités.

## ***Conclusion et perspectives***

## Conclusion et perspectives

Notre étude a mis en avant la complexité du pathosystème *Phoma macdonaldii* Boerema / *Helianthus annuus* L. et confirme l'importance de la prise en compte permanente des trois composantes qui participent à la mise en place et au devenir de la maladie : l'agent pathogène, la plante hôte et l'environnement.

*Phoma macdonaldii* présente une très grande variabilité phénotypique (croissance, pycnidiogenèse, agressivité, et pigmentation). Cette variabilité est mise en évidence pour les isolats monospores sauvages et pour les isolats génétiquement modifiés qui expriment le gène de la GFP. Ces isolats GFP, obtenus au laboratoire au cours de ce travail, ont montré que les caractères phénotypiques étudiés ont été modifiés par comparaison avec les souches sauvages d'origine. On retiendra notamment que certaines souches GFP ont vu leur agressivité augmentée ou diminuée par rapport aux souches sauvages d'origine. Ces souches GFP constituent donc des outils biologiques de choix qui, grâce aux événements insertionnels, pourront permettre de rechercher les gènes de *Phoma macdonaldii* impliqués dans la virulence et de manière plus large dans le pouvoir pathogène de ce champignon.

Les méthodes de contamination précoces mises au point sur racines et collet ont permis de tester l'agressivité des souches et de mettre en évidence des interactions isolat/génotype. Ces tests biologiques reproductibles nous ont par ailleurs amené à étudier la spécificité des isolats de *Phoma macdonaldii* vis-à-vis de son hôte, le déterminisme génétique de la tolérance du tournesol pour ces deux organes et de suivre la mise en place de la maladie au niveau histologique et cytologique.

Les données concernant la variabilité de l'agent pathogène, complétées par les résultats de notre étude sur l'adaptabilité et la spécificité des isolats de *Phoma macdonaldii*, montrent l'importance de disposer de souches représentatives de la

diversité du champignon et mettent en avant la nécessité d'identifier les pathotypes potentiels du champignon afin de les prendre en compte pour la réalisation de programmes de sélection fiables. Cette étude devra prendre en compte la spécificité de réponse de la plante hôte mise en évidence en fonction de l'organe considéré (tige, collet et racines).

Dans cet objectif, il s'agira dans le cadre de la détermination de pathotypes, de travailler sur un large panel d'isolats français. Cette collection devra être représentative de la population française de l'agent pathogène dans la mesure où les isolats seront issus de différentes régions de culture du tournesol et issues de symptômes sur tige, sur collet et si possible sur racines. Cette collection pourra être complétée par des prélèvements de nouvelles souches issues d'un matériel végétal dont le comportement au champ aura été modifié. Il faudra par la suite instaurer une « veille » qui permettra de suivre l'évolution de la population au niveau national et international en partenariat avec les différents acteurs de la profession (sélectionneurs, pathologistes...).

L'étude histologique et cytologique concernant les modalités de l'infection a permis de montrer qu'au cours de la pénétration, aucun organe spécialisé de type appressorium n'est formé par *Phoma macdonaldii* que le génotype soit sensible ou tolérant à la maladie. Par la suite, le développement de l'agent pathogène, notamment suivi grâce aux souches GFP, se fait de façon plus intense et plus rapide dans le cas du génotype sensible. Cette différence se traduit par une colonisation des vaisseaux conducteurs dès 5 jours après contamination pour le génotype sensible. Sept jours après inoculation, le champignon pathogène reste cantonné à la zone du phloème dans le cas du génotype tolérant. L'étude cytologique nous a permis de mettre en évidence des modifications des hyphes notamment lors de la colonisation du génotype sensible. On note notamment la présence de corps lipidiques et des trous au niveau de leur paroi de l'hyphe. Au final, on observe dans ce cas que de nombreux hyphes sont morts. L'ensemble de ces résultats conforte les études

réalisées précédemment sur le même pathosystème au niveau du pétiole du cotylédon : la mise en place de la maladie se fait de manière sensiblement analogue quelque soit le niveau de tolérance de l'hôte. Le développement de l'infection est par contre plus lent lorsque le tournesol est tolérant. Cependant, à ce stade, aucun phénomène significatif de fluorescence pouvant expliquer ces différences de cinétique et être associé à des mécanismes de défense n'a pu être mis en évidence.

Des études similaires devront maintenant être envisagées pour les mêmes organes sur des plantes contaminées à des stades phénologiques proches de ceux pour lesquels le développement de la maladie peut être observé au champ. L'avantage procuré par la transformation préalable de souches de *Phoma macdonaldii* avec le gène de la GFP pourra être mis à profit pour rechercher au niveau histologique et cytologique des éléments permettant d'expliquer le déterminisme de la tolérance du tournesol.

Une autre grande partie de notre étude concerne le déterminisme génétique de la tolérance du tournesol à *Phoma macdonaldii*. Nous avons effectué un test de contamination sur tige sur une population de 88 familles F3 issues de croisement entre un mutant 'M3-8' et sa lignée originelle 'AS-613'. Pour ce premier test, une étude génétique quantitative basée sur l'analyse de variance, le gain génétique et l'héritabilité a été réalisé.

Les résultats de notre étude génétique quantitative nous ont confirmé l'homogénéité des conditions de notre essai ainsi que la représentativité de la population étudiée. De plus, une grande variabilité entre les différentes familles F3 a été démontrée. Le gain génétique présenté par la différence entre le meilleur parent M3-8 et la meilleure famille est significatif. En effet, 10% des meilleures familles F3 ont des valeurs supérieures par rapport à leurs deux parents. L'héritabilité présente une valeur de 69.50%. Nous pouvons dire que la résistance partielle à *Phoma*

*macdonaldii* est hautement héritable. Une sélection à partir de ce caractère pourrait donc être efficace.

Enfin, il est important de noter que cette étude sera complétée par un étude moléculaire, afin d'obtenir un nombre de marqueurs polymorphes pour construire une carte génétique. Ce travail va nous permettre de déterminer des QTLs contrôlant la résistance partielle au Phoma et d'effectuer une sélection assistée par marqueurs sur les différentes familles F3.

L'étude du contrôle génétique de la résistance partielle du tournesol à *Phoma macdonaldii* a également été menée suite à une contamination sur collet ou une inoculation racinaire dans un programme de croisements diallèles. Plusieurs lignées de tournesol et leurs hybrides F1 ont ainsi été confrontées à 4 isolats différents de *Phoma macdonaldii*.

L'importance de l'aptitude générale à la combinaison (AGC) et de l'aptitude spécifique à la combinaison (ASC) implique que les parents ont une influence importante sur les performances des lignées filles déterminant la réponse à la maladie. Ainsi, les méthodes de sélection classiques peuvent être recommandées afin d'améliorer génétiquement la résistance partielle au phoma du collet ou de la racine. Dans le cas de l'isolat TA4, le ratio AGS/ASC est inférieur à 1, montrant l'importance d'effets génétique non additifs. L'existence d'une grande part de variance non additive dans le contrôle de la résistance montre l'importance de la production d'hybrides F1 afin de contrôler la maladie causée par les différents isolats.

Pour compléter l'étude de la résistance à *Phoma macdonaldii*, nous avons réalisé deux autres essais : un essai de contamination sur collet sur 98 lignées recombinantes et leurs deux parents 'PAC-2' et 'RHA-266' et un autre sur racine, sur 83 lignées recombinantes du même croisement. Nous avons utilisé deux souches (TA6, TA9) pour la contamination sur collet et deux autres (TA2, TA4) pour contaminer aux racines.

Les analyses de variance ont montré un effet fortement significatif du génotype pour la résistance au Phoma. La différence entre les lignées recombinantes et la moyenne de leurs deux parents est non significative pour les deux tests, ce qui indique que les lignées recombinantes utilisées sont représentatives de la population formée par hybridation entre les deux génotypes parentaux.

Un gain génétique a été obtenu en comparant 10% de lignées recombinantes sélectionnées avec la moyenne de leurs deux parents pour les deux organes étudiés (collet et racine). Ce phénomène considéré comme gain génétique pourrait être dû à la nature polygénique de la résistance à ces deux maladies et à l'accumulation des allèles favorables pour la résistance chez les lignées recombinantes sélectionnées.

L'héritabilité s'est avérée importante pour la résistance partielle à différents isolats sur racine ou sur collet, comprise entre 44% et 48%, valeurs proche 58%, de celle trouvée par Rachid-Al-Chaarani *et al* (2002).

D'autre part, 23 QTLs ont été détectés pour la résistance au Phoma. Les variances phénotypiques dues à l'effet des QTLs sont modérées. Elles sont comprises entre 10% et 30% pour les deux organes.

Nos travaux ont mis en évidence des régions chromosomiques liés à la résistance aux Phoma. Une approche intéressante à envisager pour la suite de nos recherches est de préciser les régions impliquées à ce caractère.

Afin d'identifier précisément la zone du génome impliquée dans l'expression de la résistance au Phoma, il est envisageable de réaliser des croisements entre RILs présentant un polymorphisme dans l'intervalle de cette zone. Après recombinaison génétique, il devrait être possible d'identifier des lignées représentant des recombinaisons dans cette zone et d'évaluer ces lignées, ce qui permettrait d'identifier les marqueurs étroitement liés au caractère étudié.



## ***References bibliographiques***

- Abadie M. and Boudart G., (1982).** Etude cytologique et ultrastructurale de la nécrose des crucifères due à *Leptosphaeria maculans* forme conidienne *Phoma linguam*. Annales des Sciences Naturelles, *Botanique*. **13**(4):53-72.
- Abou Al Fadil T., Dechamp-Guillaume G., Pourmohamad Kiani S., Sarrafi A., (2004).** Genetic variability and heritability for resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. & Breed.* **58**:323-328(2004).
- Abou Al Fadil T., Dechamp-Guillaume G., Darvishzadeh R., and Sarrafi. A. (2006a).** Genetic control of partial resistance to collar and root necrosis caused by *Phoma macdonaldii* in sunflower *European Journal of Plant Pathology*
- Abou Al Fadil T., Poormohammad Kiani S., Dechamp-Guillaume G., Gentzbittel L., Sarrafi.A., (2006).** QTL mapping of partial resistance to *Phoma* collar and root necrosis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Soumis à Plant science.
- Acimovic M (1984).** Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia, 1981-1983. *Helia* 7: 45-54
- Albourie J.M., Tourvieille J., and Tourvieille de Labrouhe D. (1998).** Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology*, **104**(3):235-242.
- Al-ChaaraniL G. Gentzbittel L., Huang X., Sarrafi A., (2004).** Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits using AFLP and SSR in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theor. Appl. Genet.* **109** 1353-1360.
- Angevain M. (1984).** Mise au point d'une méthode de sélection de la luzerne contre *Phoma medicaginis* Malbre. et Roum. Montpellier, France, Thèse de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- Anonyme ( 1998).** Semences et progrès, **94**:62-77.
- Basten CJ., Weir BS. and Zeng Z-B. (1999).** QTL cartographer, Version 1.13: programme in statistical genetics. Raleigh: North Carolina State University.
- Beckerman J.L. and Ebbola D.J. (1996).** MPG1, a gene encoding a fungal hydrophobin of *Magnaporthe grisea*, is involved in surface recognition. *Mol plant Microbe Interact*, **9**:50-456.

- Bert P.F., Dechamp-Guillaume G., Serre F., Jouan I., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Vear F., (2004).** Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldi*. *Theor Appl Genet*, **109**(4) : 865-74.
- Bert P.F., Tourvieille de Labrouhe D., Philippon J., Mouzeyar S., Jouan I., Nicolas P. and Vear F. (2001).** Identification of a second linkage group carrying genes controlling resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Theoretical and Applied Genetics*, **106**:992-997.
- Bert PF., Jouan I., Tourvielle de Labrouhe D., Serre F., Nicolas P. and Vear F (2002)** Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theor Appl Genet* **105**: 985-993
- Boerema G.H. (1970).** Additional notes on *Phoma herbarum*. *Persoonia*. **6**:15-45.
- Bonjon A., (1986).** tournesol de France, Edition union des coopératives Agricoles de Semences de Toulouse,187P
- Boye, L.A., P.H. Smith, A.H. Wilson and P.N. Minchin (2002).** Mutations in wheat showing altered field resistance to yellow and brown rust. *Genome* **45**:1035–1040.
- Brahm L., Rocher T., and Friedt W.,( 2000).** PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew. *Crop Science*, **40**:676-682.
- Carson M.L. (1991).** Relationship between Phoma Black Stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Disease*, **75**:1150-1153.
- Castano F, Vear F., Tourvieille de Labrouhe D. (1993)** Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. *Euphytica* **68**: 85-98
- Castano F., Hemery-Tardin MC., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F. (1992).** The inheritance and biochemistry of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* leaf infections in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Euphytica* **58**: 209-219
- Castano F., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D. (1989).** L'utilisation de plusieurs tests simultanés dans la sélection pour la résistance du tournesol vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Informations Techniques du CETIOM* **107**: 14-20

- Chadefaud M., Emberger L (1960).** Les végétaux vasculaires. Tome II du Traité de Botanique Systématique, Masson, Paris, 1540 p.
- Cunningham, G.H., (1927).** Dry-rot of swedes and turnips : its cause and control. New Zealand Department of Agriculture, *Bulletin* **133**-51.
- Decognet V., (1994).** *Phoma exigua* var. **linicola**, agent du mort-lin : variabilité et mode d'infection du parasite, expression de la maladie. Rennes, France, Thèse de l'Université de Rennes.
- Delwiche, P.A., (1980).** Aspects of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance to rapeseed *Brassica napus*. Madison, USA, Thèse de l'Université du Wisconsin.
- Degener J., Melchinger AE., Hahn V (1999).** Resistance in the leaf and stem of sunflower after infection with two isolates of Phomopsis. *Plant Breeding* **118**: 405-410
- Deglène L, Alibert G, Lesigne P, Tourvieille de Labrouhe D, Sarrafi A (1999).** Inheritance of resistance to stem canker (*Phomopsis helianthii*) in sunflower. *Plant Pathology* **48**: 559-563.
- Deising H., Nicholsson R.L., Haug,M., Howard,R.J. and Mendgen K (1992)** Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *Plant cell*, **4**:1101-1111
- De Vienne D., Causse M. (1998).** La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. In. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Edit. INRA 200 p.
- Donald P A., Bugbee W.M., and Venette J.R. (1986).** First report of *Leptosphaeria maculans* (sexual stage of *Phoma macdonaldii*) on sunflower in North Dakota and Minnesota. *Plant Disease*, **70**:4, 352.
- Donald, P.A., Venette, J.R. and Gulya, T.J. (1987).** Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Dis.***71**:466-468.
- Doss R.P., Potter S.W., Soeldner A.H., Christian J.K. and Fukunaga L.E. (1995).** Adhesion of germings of *Btrytis cinerea* *Appl Environ Microbiol.* **61**:260-265
- Du, W., Z. Huang, J. E. Flaherty, K. Wells, and G. A. Payne (1999).** Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus* *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:834-836.

- Dumas B., Centis S., Sarrazin N. and Esquere-Tugaye M.T. (1999).** Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1769-1771.
- Eberhart SA, Russell WA (1966).** Stability parameters for comparing varieties. *Crop Sci.* **6**: 36-40.
- Evans, D.A., (1989).** Somaclonal variation : genetic basis and breeding application. *Trend Genetics.* **5**: 46-50.
- Fayret J., Quenin H. and Perny A. (1996).** Evolution de l'état sanitaire des semences de tournesol, conséquence des attaques de capitules par *Phomopsis helianthi* et *Phoma macdonaldii*. *Phytoma, La Défense des Végétaux*, **487**:37-40.
- Faris M.A., Lira M.A., Leao Veiga A.S. (1979).** Stability of sorghum midge resistance. *Crop Sci.* **19**: 577-580.
- Fayzalla S. and Maric A. (1981).** Contribution à l'étude de la biologie et de l'épidémiologie de *Phoma macdonaldii* Boerema provoquant la maladie des taches noires du tournesol. *Zastita Bilja*, **32**:13-27.
- Fernandez-Martinez J., Mancha M., Osorio R. and Garces (1997).** Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic background. *Euphytica* **97**: 113–116.
- Flores Berrios E., Gentzbittel L, Kayyal H., Alibert G. and Sarrafi A. (2000a).** AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* **101**: 1299-1306
- Frezzi M.J. (1968).** *Leptosphaeria lindquisti* n.sp., forma sexual de *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc., hongo causal de la "mancha negra del tello" del girasol (*Helianthus annuus* L.) en Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, **5**:77-80.
- Gaudet M.D., and T.J. Schultz. (1984).** Association between a sunflower fungal pathogen, *Phoma macdonaldii*, and a stem weevil *Apion occidentalis* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, **116**:1267-1273.
- Gigandon C., Merrien A. (2000).** Tournesol. Edition CETIOM, p34.
- Griffing B. (1956).** Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Science* **9**:463-493

- Grey, F.A., Fernandez J.A. and J.L. Horto, (1990).** Variation among isolates of *Phoma medicaginis* var. *medicaginis* in spore production *in vitro* and symptom expression on excised leaves of alfalfa. *Plant disease*, 74:668-670.
- Haley C.S. and Knott S.A. (1992).** A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324
- Hamid A.H., Ayers J.E., Hill R.R. Jr (1982).** Host isolate interactions in corn inbreds inoculated with *Cochliobolus carbonum* race 3. *Phytopathology* 72: 1169-1173.
- Hammond K.E., Lewis B.J. and Musa T.M., (1985).** A systemic pathway in the infection of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology*, 24:557-565.
- Hassan A.K., Schulz C., Sacristan M.D. and Wöstemeyer J. (1991).** Biochemical and molecular tools for the differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam*. *Journal of Phytopathology*, 131:120-126.
- Hanacziwskyj, P. and R.B. Drysdale (1984).** Cultural and biochemical characteristics of isolates of *Leptosphaeria maculans* varying in pathogenicity. *Aspects of Applied Biology*, 6:387-397.
- Heiser C.B. (1969).** The North American sunflowers (*Helianthus*). *Mem. Torrey Bot. Club* 22: 1-218.
- Hervé D., Fabre F., Flores Berrios E., Leroux N., Al charani G., Planchon C., Sarrafi A., Gentzbittel L. (2001).** QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under green house condition. *J. Exp. Bot.* 362 1857-1864
- Hill C.B., Xu X.H. and Williams P.H. (1984).** Correlations of virulence growth rate, pigment production and allozyme banding patterns which differentiate virulent and avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Cruciferae Newsletter*, 9:79.
- Horowitz, S., Freeman S., and Sharon A. (2002).** Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 92:743-749.
- Hua Z. and Ma G., (1996).** A review of sunflower disease research in China. Beijing, China. In *Proceedings of the Fourteenth International Sunflower Conference* 2:754-759.
- Idnurm A. and Howlett, B.J. (2001).** Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol.* 2:241-255.

- Ivanov P., Petakov D., Nikolova V. and Petchec E. (1988).** Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. In Proc. 12th Int. Sunflower Association, Toowoomba, Australia, p. 463–465.
- Jambhulkar S.J. (2002).** An extreme dwarf mutant in sunflower. *Curr. Sci.* **83**:116
- Jan C.C. (1992).** Inheritance and allelism of mitomycin C- and streptomycin-induced recessive genes for male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci* **32**: 317–319.
- Jan C., and Rutger J.N., (1988).** Mitomycin C-and streptomycininduced male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci* **28**: 792–795.
- Jelitto T.C., Page H.A. and Read N.D. (1994).** Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Planta*. **194**:471-477
- Jenns A.E, Leonard K.J., Moll R.H. (1982).** Stability analysis for estimating relative durability of quantitative resistance. *Theor Appl Genet* **63**: 183-192.
- Jorgensen, J.H.(1992).** Multigene families of powdery mildew resistance genes in locus Mla on barley chromosome 5. *Plant Breed.* **108**:53–59.
- Kearsey MJ, Hyne V (1994).** QTL analysis: a simple “marker-regression” approach. *Theor Appl Genet* **89**: 698-702
- Koch, E., Badawy H.M.A. and Hoppe H.H. (1989).** Differences between aggressive and nonaggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *Journal of Phytopathology*, **124**:52-62.
- Kohet R J and Bira L. S., (2002).** Inheritance and linkage analysis of the yellow pulvinus mutant of cotton. *J. Cotton Sci.***6**:115-118.
- Kolattaudy P.E., Rogers L.M., Li D., Hwang C.S. and Flaishman M.A. (1995).** Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**:4080-4087.
- Lander E.S., Botstein D. (1989).** Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185-199
- Lagopodi A., Ram A., Lamers G., Punt P., Van den Hondel, Lugtenberg B., and G. Bloemberg. (2002).** Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersiciradicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**:172-179.

- Larfeil C. (2003).** La maladie des taches noires du tournesol causée par *Phoma macdonaldii* Boerema : variabilité phénotypique et moléculaire – évaluation de la sensibilité des géotypes à la maladie – modalités de l'infection. Castanet Tolosan, France. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, **102** p.
- Leclercq P. (1969).** Une stérilité cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plant* 19 : 99-106
- Leonard K.J., Moll R.H. (1981).** Durability of general resistance: evaluation of cultivar isolate interaction. In *Proc. Symposia, IX Inter. Congr. Plant Protection*, Washington, DC, USA, August 5-11, 1979. Vol. I, pp. **190-193**.
- Liu B.H. (1998).** Statistical genomics : linkage mapping and QTL analysis. CRC press LLC. Edit p600
- Lofgren J.R. and Rama Raju N.V. (1982).** Chemically induced mutations in sunflower. in *Proc. 10<sup>th</sup> Int. sunflower conf., surfers Paradise, Australia*. 14-18 March. Int. Sunflower assoc., Paris, France, p.264-268
- Mac Donald W.C. (1964).** *Phoma* Black Stem of Sunflowers. *Phytopathology*, 54:492-493.
- Madjidieh-Ghassemi S. (1988).** Studies of some important fungal diseases of sunflower in Iran. Novi sad, Yugoslavia : In *Proceedings of the Twelfth International Sunflower Conference*, 2:22-3.
- Manly K.F. and Olson J.M. (1999).** Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mammalian Genome* 10: 327-334
- Maor R., M. Puyesky, Horowitz B.A. and A. Sharon (1998).** Use of the green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol. Res.* **102**:491-496.
- Maric A.D., Masiveric S. and Fayzalla S.,( 1981).** Présence de *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi, stade terminal du champignon *Phoma macdonaldii* Boerema, responsable de la maladie noire du tournesol en Yougoslavie. (in Serbo-Croatian). *Zastija bilja*. **32**:329-344.
- Maric A., Camprag D. and Masirevic S. (1987).** La tacheture noire du tournesol (*Phoma macdonaldii* Boerema ; synonymes : *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc. Stade terminal : *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi). (in Serbo-Croatian), *Bolesti i stetocine suncokretai njihovo suzbijanje*, 37-45.



- Maric A. and Schneider R. (1979).** Die Schwartzfleckenkrankheit der Sonnenblume in Jugoslawien und der Erreger *Phoma macdonaldii* Boerema. *Phytopathologische Zeitschrift* **94**, 226–233.
- Markel P.D., Fulker D.W., Corley R.P. and De Fries J.C. (1996).** Quantitative trait loci for ethanol sensitivity in the LSxSS recombinant inbred strain: interval mapping. *Behav Genet* **26**: 447-458
- Mendgen K. and Hahn M. (2002).** Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* **7**:352-356.
- Mengistu A., Rimmer S.R., Koch E. and P.H. Williams, (1991).** Pathogenicity groupings of isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* cultivars and their disease reaction profiles on rapid cycling brassicas. *Plant Disease*, **75**:1279-82.
- Mestries E., Gentzbittel L., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P. and Vear F. (1998).** Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Mol Breed* **4**: 215-226
- Miller J.F., and Vick B.A. (1999).** Inheritance of reduced stearic and palmitic acid content in sunflower seed oil. *Crop Sci.* **39**:364-367.
- Miric E., Aitken E.A.B. and Goulter K.C. (1999).** Identification in Australia of the quarantine pathogen of sunflower *Phoma macdonaldii* (Teleomorph : *Leptosphaeria linquistii*). *Australian Journal of Agricultural Research*, **50(3)**:325-332.
- Morrissey J.P. and Osbourn A.E. (1999).** Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**:708-724.
- Mouzeyar S., Tourvieille de Labrouhe D. and Vear F. (1994).** Effect of host-race combination on resistance of sunflower, *Helianthus annuus* L., to downy mildew *Plasmopara halstedii*. *Journal of Phytopathology*, **141**:249-258.
- Mühlberger E. (1996).** Phoma et Phomopsis du tournesol. Synthèse des connaissances acquises, contribution à l'étude biologique et épidémiologique. UPS. Toulouse, France.
- Mullins E.D., Chen X., Romaine P., Raina R., Geiser D.M. and Kang S. (2001).** *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, **91**,173-180
- Muntanola-Cvetkovic M. (1989).** Pathohistology of sunflower stems attacked by *Diaporthe helianthi*. *Canadian Journal of Botanic*, **67**:1119-1125.

- Osorio J., Feranandez-Martinez J., Mancha M. and Garces R., (1995).** Mutant sunflower with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Sci* **35**: 739-742.
- Pang K.E.C. and Halloran G.M. (1995).** Adaptability and virulence specificity in Australian strains of blackleg [*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et De Not.] on different host genotypes of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Aust. J. Agric. Res.* **46**: 971-984.
- Pascholati S.F., Yoshioka H. and Kunoh H. (1992).** Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* : cutinase is a component of the conidial exudate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **41**:53-59.
- Pascholati S.F., Desising H., Leite B., Anderson D. and Nicholson R.L. (1993).** Cutinase and nonspecific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiol Mol Plant Pathol.* **42**:37-51.
- Pedley K.F. and Walton J.D (2001).** Regulation of cyclic peptide biosynthesis in a plant pathogenic fungus by a novel transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:14174-14179.
- Penaud A. and Péres A . (1994).** Phoma du tournesol. Oléoscope 15, 37p.
- Perez-Vich B., Graces R. and Fernandez-Martinez J.M. (2000).** Genetic characterization of sunflower mutants with high content of saturated fatty acids in seed oil. *Helia*. **23**:77-87.
- Peres A. and Lefol C. (1996).** *Phoma macdonaldii* Boerema: élément de biologie et mise au point d'une méthode de contamination artificielles en conditions contrôlées. In: *Proceedings of the 14th International Sunflower Conference, Beijing, China*. Shenyang, China: *Academy of Agricultural Science*, **2**: 687-93
- Penaud A. (1996).** Phoma du tournesol: Recherche des époques de contamination et mise au point de la protection fongicide. Pages 694-699 In: *Proc. 14th Internat. Sunflower Conference, Beijing, China*, International Sunflower association, Paris, France
- Poormohammad Kiani S., Talia P., Maury P., Grieu P., Heinz R ., Perrault A ., Nishinakamasu V., Hopp E., Paniego N., Gentzbittel L. and Sarrafi A. (2006).** Development of a new AFLP and SSR genetic linkage map and identification of QTLs for photosynthesis related traits under well-watered and water-stressed conditions in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Theor Appl Genet* submitted.

- Pound G.S. (1947).** Variability of *Phoma lingam*. *Journal of Agricultural Research*, 75:113-33.
- Rachid Al-Chaarani G., Roustae A., Gentzbittel L., Mokrani L., Barrault G., Dechamp-Guillaume G. and Sarrafi A., (2002).** A QTL analysis of sunflower partial resistance to downey mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of Recombinant Imbred Lies (RILs). *Theoretical and Applied Genetics*, 104:490-496.
- Rayner, R.W., (1970).** A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institut Kew, Surrey and British *Mycological society*.
- Robert N., Vear F. and Tourvieille de Labrouhe D. (1987).** L'hérédité de la résistance au *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary chez le tournesol. I.Etude des réactions à deux tests mycéliens. *Agronomie* 7(6): 423-429
- Roustae A. (1999).** La maladie des taches noire causée par *Phoma macdonaldii* Boerema L. : Variabilité et mode d'infection de l'agent pathogène – Etude génétique de la résistance du tournesol. Toulouse, France, Thèse de l'INP de Toulouse
- Roustae A., Costes S., Dechamp-Guillaume G. and Barrault G. ( 2000a).** Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph : *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology*, 49:227-234.
- Roustae A., Barrault G., Dechamp-Guillaume G., Lesigne P. and Sarrafi A. ( 2000b).** Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. *Plant Pathology*, 49:396-401.
- Roustae A., Dechamp-Guillaume G., Gelie B., Savy C., Dargent R., and Barrault G. (2000c).** Ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma macdonaldii* in sunflower seedlings. *Phytopathology*, 90(8):915-920.
- Siddique-Mirza M., Masood A.R. and Ayub M. (1988).** Sunflower diseases in Pakistan in the period 1980-87. Novi Sad, Yougoslavia : Proceedings of the Twelfth International Sunflower Conference 2,25.
- Sippell, D., Wong R.S.C. and Hall R. (1988).** Isosyme polymorphisms differentiate isolates of *Leptosphaeria maculans* virulent and weakly virulent to *Brassicae napus*. *Phytopathology*, 78:1511

- Sharpino A.D. (2000).** Using *Arabidopsis* mutants to delineate disease resistance signalling pathways. *Can. J. Plant Pathol.* **22**:199-216.
- Smolik J. D., Walgenbach D.D. and Carson M.L. (1983).** Initial evaluations of early dying of sunflower in South Dakota. Pages 24-25 In: Proc. Sunflower Res. Workshop, Fargo.
- Soldatov K.I. (1976).** Chemical mutagenesis in sunflower breeding. In: Proceeding of the VIIIth International sunflower Conference. Vol. 1. Krasnodar, pp. 352-357
- Swart W.J., Ingfield M.J, Palmer M.A. and Blanchette R.A. (1991).** Variation among South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology*, **81**:489-493.
- Tang S., Yu J.K., Slabaugh M.B., Shintani D.K. and Knapp S.J. (2002).** Simple sequence repeat map of the sunflower genome, *Theor Appl Genet.* **105** 1124–1136.
- Tewari J.P. (1986).** Subcuticular growth of *Alternaria brassicae* in rapeseed. *Canadian Journal of Botanic*, **64**:1277-1281.
- Thuault MC. and Tourvieille de Labrouhe D. (1988).** Etude du pouvoir pathogène de huit isolats de *Sclerotinia* appartenant aux espèces *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor* et *Sclerotinia trifoliorum* sur tournesol. *Informations Techniques du CETIOM* 103: 21-27
- Tourvieille D. and Vear F.(1984).** La sélection du tournesol pour une meilleure résistance au *Sclerotinia sclerotiorum*. *Informations Techniques du CETIOM* **88**: 3-23
- Tourvieille de Labrouhe D. and Vear F. (1986).** *Sclerotinia* : lutte pour l'amélioration génétique, la résistance. *La Défense des Végétaux* **238**: 16-21
- Tourvieille de Labrouhe D., Champion R., Vear F., Mouzeyar S. and Said J. (1988).** Une nouvelle race de mildiou en France. *CETIOM Inform. Tech* **104**: 3-10
- Tucker S.L. and Talbot N.J. (2001).** Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopatol.* **39**:385-417.
- Van der Planck. J.E. (1968).** Disease resistance in plants. Academic Press Inc., New-York and London, 206p. Traduit de l'anglais par H. Barat, 1974. Résistance des plantes aux maladies. *Agence de coopération culturelle et techniques*, 223p.
- Van Kan J.A., Van't Klooster J.W., Wagemakers C.A., Dees D.C. and Van der Vlugt-Bergmans C.J. (1997).** Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not

essential, during penetration of gerbera and tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 30-38.

**Vear F. and Leclercq P. (1971).** Deux nouveaux gènes de résistance au Mildiou du tournesol. *Ann. Amélior. Plantes*, **31(3)**:251-255.

**Vear F., Gentzbittel L., Philippon J., Mouzeyar S., Mestries E., Roeckel-Drenet P., Tourvieille de Labrouhe D. and Nicolas P. (1997).** The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* **95**: 584-589

**Viguié A., Vear F. and Tourvieille de Labrouhe D. (1999).** Interactions between French isolates of *Phomopsis/Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. and sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, **105**:693-702.

**Vranceanu A.V., Craiciu D., Soare G., Pacureanu M., Voinescu G. and Sandu I. (1994).** Sunflower genetic resistance to *Phomopsis helianthi* (Munt.-Cvet.) attack. *Romanian Agricultural Research*, 1:9-11.

**Walton J.D. (1994).** Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* **71**:5201-5205.

**Williams P.H. (1985).** Crucifer Genetics Cooperative (CrGC) Resource Book. Madison, USA: Department of Plant Pathology, University of Wisconsin.

**Williams P.H. (1992).** Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **14**:30-35.

**Xiao J.Z., Ohshima A., Kamakura T., Ishiyama T. and Yamaguchi I. (1994).** Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol.* **7**:639-644.

**Zeng Z.B. (1993).** Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proceeding National Academy of Science USA* **90**: 10972-10976

**Zeng Z.B. (1994).** Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**: 1457-1468

**Zimmer D.E. and Kinman M.L. (1972).** Downy mildew resistance in cultivated Sunflower and its inheritance. *Crop Science*, **12**:749-751.

# ***Annexes***

## ***Annexe 1***

### ***Préparation des milieux de culture du champignon***

#### ***Milieu PDA***

P.D.A.	39 g
Eau distillée q.s.p.	1 000 mL
Autoclaver et ajuster le pH à 6	

#### ***Milieu V8***

Agar	8 g
V8	80 mL
Eau distillée	320
Autoclaver et ajuster le pH à 6	

Note : le V8 est une préparation à base de jus de légumes concentré, de composition suivante :

jus de tomate, carottes, céleri, betteraves, persil, laitue, cresson, épinards  
sel 0.75 %  
extrait d'épices  
eau

#### ***Milieu PDB (1 litre) :***

24g de poudre  
1000ml d'eau distillée  
pH 6 – autoclavage 20mn à 120°C

## *Annexe 2*

### ***Solution de contamination (100ml) :***

0.25g de gélatine (0,25%)

500µl de jus d'orange (non traitée) fraîchement pressé (0.5%)

99.5ml d'eau distillée

Autoclavage 20min

Ajuster à pH6

Déposer un peu de solution à la surface d'une culture de âgée de 10 jours  
obtenue sur milieu P.D.A.

Décrocher le spores par aspiration /refoulement .

Récupérer l'inoculum

Comptabiliser le nombre de spores (cellule de Malassez) :la concentration doit  
être de  $10^6$  spores /ml .



### *Annexe 3*

#### *Composition des milieux MS (Murashige et skoog, 1962),*

##### **Macroéléments** MS/Concentration dans milieu de culture (mg/l)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

##### **Microéléments**

KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025

##### **Source de fer**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.3

##### **Vitamines**

Myo-Inositol	100
Acide nicotinique	0.5
Pyrdoxine-Hcl	0.5
Thianamine-Hcl	0.5
Glycine	2.5

#### *Milieu MS (Murashige&Skoog)(Solide).*

Murashige and Skoog basalt salt mixture	4.3 g/l
Vitamines	1 ml/l
Saccharose	10 g/l

Agar –Agar 7 g/l

PH 5.7 avant autoclavage.

Milieu de culture M utilisé dans la culture des racines de carottes et dans les essais de cultures champignon tournesol en boîtes Magenta.

<b>Macroéléments</b>	(mg.l <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	731
KNO <sub>3</sub>	80
KCl	65
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.8
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	288
NaFe EDTA	8
KI	0.75

<b>Microéléments</b>	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	6
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.65
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.5
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.13
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.0024

<b>Vitamines</b>	
Glycine	3
Thiamine HCl	0.1
Pyridoxine	0.1
Acide nicotinique	0.5
Myoinositol	50
Phytogel	3g/l

1\*Préparation d'une solution mère 10x d'acide citrique pH6 0,1M

Solution A : acide citrique 0,1M

solution B : citrate de sodium 0,1M

41,5 ml de solution B + 8,5 ml solution A : solution mère 10x 0,1 M pH6

2\*diluer au 1/10 avec la solution mère

Ajouter au moins 3 volumes de tampon pour 1 volume de gélose

Laisser sous agitation rotative lente (la fusion est plus efficace si on se

Place à 30°C.

## *Annexe 4*

Produit	Formule	Masse molaire(g /mol)	Quantité pour 100ml de stock	Voulume pour 1 L de milieu
Calcium chloride	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	147,02	13,20g	1ml
Magenesium Sulfate	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	246	12,00g	1 ml
Potassium dihydrogeneo- phosphate	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	10,00g	1ml
DiSodium hydrogeno-phosphate di-hydrate	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	177,99	7,50g	2 ml
Ammonium iron(III)citrate,brown	=ferric ammonium citrate	16,5-18,5 %fer	0,50g	1ml
Chorure de Manganese	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	197,91	10 mg	100 µl
Sulfat de Cuivre	CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	249,68	10 mg	100 µl
Chlorure de Zinc	ZnCl	136,28	10 mg	100 µl
Acide Orthoborique	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	10 mg	100 µl
Sodium Molybdate	NaMo O <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	241,95	10 mg	100 µl

## Annexe 5

### SOLUTIONS ET MILIEUX pour transformation champignons (d'après Tkacz et al.)

Solution	Composition	stock 10x (g/L)	AB	GI broth	GI agar
AB salts 1	NH <sub>4</sub> Cl MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O KCl	10g 3g 1.5 g	1 vol	1 vol	1 vol
AB salts 2 *	CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	100 mg 25 mg	1 vol	1 vol	1 vol
AB phosphate (pH ajusté à 7)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaHPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	30 g 10 g	1 vol		
AB glucose	glucose	50 g	1 vol		
GI phosphate	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	6.9 g	-	-	1 vol
GI Carbon	glucose Glycérol	18 g 50 g	-	1 vol	1 vol
GI MES * (pH ajusté à 5.2)	MES / NaOH	97.5 g	-	1 vol	1 vol
H <sub>2</sub> O stérile			6 vol	6 vol	
Agar 2x stéril	3% agar		-	-	5 vol

Remarques :

\* stérilisé par filtration 0,22µm

GI broth est sans phosphate

GI agar doit contenir de l'acétosyringone (AS) à concentration finale de 200 µM pour induire les gènes vir (ajouter une solution stock d'AS 1000x préparée dans EtOH ou DMSO)

## Annexe 6

Tableau ( 1 ) : Analyse de variance des données de la croissance radiale en cm des souches de *Phoma macdonaldii* après 4, 7 et 10 jours de culture sur milieu PDA à 25°C.

		4 Jours			7 Jours			10 Jours		
Paramètres	DLL	CM	F. valeur	Pr (>F)	CM	F. valeur	Pr (>F)	CM	F. valeur	Pr (>F)
Isolat	9	0.0563	179.58	2.2e-16***	0.041	193.87	2.2e-16***	0.109	31.211	7.404e-10***
Résidu	20	0.00031			0.0004			0.00351		

Tableau ( 2 ) : Analyse de variance des données de la croissance radiale en cm des souches de *Phoma macdonaldii* après 4, 7 et 10 jours de culture sur milieu V8 à 25°C.

		4 Jours			7 Jours			10 Jours		
Paramètres	DLL	CM	F. valeur	Pr (>F)	CM	F. valeur	Pr (>F)	CM	F. valeur	Pr (>F)
Isolat	9	0.602	28.768	1.55e-09***	0.094	41.369	5.494e-11***	0.158	17.771	1.085e-07***
Residu	20	0.00209			0.0022			0.00889		

CM: Carré moyen, Résidu : erreur, DLL: degré de liberté, \*: 0,05% (risque de première espèce), \*\*\* : 0,001% (risque de première espèce),  
F valeur= CM isolat /CM Résidu, Pr : probabilité

Tableau ( 3 ) : Analyse de variance des données de la croissance radiale en cm des souches transformées de *Phoma macdonaldii* après 4, 7 et 10 jours de culture sur milieu PDA à 25°C.

		4 Jours			7 Jours			10 Jours		
Paramètres	DDL	CM	F. valeur	Pr (>F)	CM	F. valeur	Pr (>F)	CM	F. valeur	Pr (>F)
Isolat	17	0.0073	3.167	0.0017	0.026	8.060	9.053e-08***	0.0555	8.044	9.281e-08***
Residu	36	0.0023			0.0032			0.0069		

Tableau ( 4 ) : Analyse de variance des données de la croissance radiale en cm des souches transformées de *Phoma macdonaldii* après 4, 7 et 10 jours de culture sur milieu V8 à 25°C.

		4 Jours			7 Jours			10 Jours		
Paramètres	DDL	CM	F. valeur	Pr (>F)	CM	F. valeur	Pr (>F)	CM	F. valeur	Pr (>F)
Isolat	9	0.00183	1.171	0.3337	0.0033	3.414	0.00095***	0.0126	4.762	4.105e-05***
Residu	20	0.00156			0.00097			0.002		

CM : Carré moyen, Résidu : erreur, DDL : degré de liberté, \*: 0,05% (risque de première espèce), \*\*\* : 0,001% (risque de première espèce),  
F valeur= CM isolat /CM Résidu, Pr : probabilité

Tableau (5): Sporulation des souches sauvages  
de *Phoma macdonaldii*

Paramètres	DDL	CM	F. valeur	Pr (>F)
Isolat	9	17.323	680.58	2.2 e-16***
Résidu	20	0.025		

CM: Carré moyen Résidu : erreur, DDL: degré de liberté, \*\*\* : 0,001% (risque de première espèce),  
F valeur= CM isolat /CM Résidu, Pr : probabilité

Tableau (6): Sporulation des souches transformées  
de *Phoma macdonaldii*.

Paramètres	DDL	CM	F. valeur	Pr (>F)
Isolat	17	54.56	305.89	2.2 e -16***
Résidu	36	0.18		

CM: Carré moyen, Résidu : erreur, DDL: degré de liberté, \*\*\* : 0,001% (risque de première espèce),  
F valeur= CM isolat /CM Résidu, Pr : probabilité

Tableau (9): Analyse de variance des données de l'évaluation de l'agressivité des souches de *Phoma macdonaldii*, 7 jours après inoculation du collet de plantules de tournesol.

Paramètres	DDL	CM	F. valeur	Pr (>F)
Génotype	1	0.778	3836.9	2.2 e-16***
Isolat	3	0.377	1862.6	2.2 e-16***
Génotype x Isolat	3	0.229	1131.6	2.2 e-16***
Residu	16	0.00020		

CM: Carré moyen, Résidu : erreur, DDL: degré de liberté, \*\*\* : 0,001% (risque de première espèce),  
F valeur= CM isolat /CM Résidu, Pr : probabilité

Tableau ( 10 ) : Analyse de variance des données de l'évaluation de l'agressivité des souches de *Phoma macdonaldii* transformées, 7 jours après inoculation du collet de plantules de tournesol

Paramètres	DDL	CM	F. valeur	Pr (>F)
Génotype	1	1.6785	3845.89	2.2 e-16***
Isolat	17	0.0493	113.152	2.2 e-16***
Génotype x Isolat	17	0.0262	60.164	2.2 e-16***
Residu	72	0.00044		

CM: Carré moyen, Résidu : erreur, DDL: degré de liberté, \*\*\* : 0,001% (risque de première espèce),  
F valeur= CM isolat /CM Résidu, Pr : probabilité



Tableau (11) : Analyse de variance des données de l'évaluation de l'agressivité des souches de *Phoma macdonaldii*, 7 jours après inoculation des racines de plantules de tournesol.

Paramètres	DDL	CM	F. valeur	Pr (>F)
Génotype	1	1.212	322.110	5.046e-12***
Isolat	3	0.0534	14.202	8.965 e-05***
Génotype x Isolat	3	0.0176	4.701	5.01543*
Residu	16	0.0037		

CM : Carré moyen, Résidu : erreur, DDL : degré de liberté, \*: 0,05% (risque de première espèce), \*\*\* : 0,001% (risque de première espèce), F valeur= CM isolat /CM Résidu, Pr : probabilité

Tableau (12) : Analyse de variance des données de l'évaluation de l'agressivité des souches de *Phoma macdonaldii* GFP, 7 jours après inoculation des racines de plantules de tournesol.

Paramètres	DDL	CM	F. valeur	Pr (>F)
Génotype	1	0.09112	188.323	2.2e-16 ***
Isolat	10	0.08578	177.283	2.2e-16 ***
Génotype x Isolat	10	0.00730	15.094	3.395e-11 ***
Residu	44	0.00048		

CM : Carré moyen, Résidu : erreur, DDL : degré de liberté, \*: 0,05% (risque de première espèce), \*\*\* : 0,001% (risque de première espèce), F valeur= CM isolat /CM Résidu, Pr : probabilité

## Annexe 7

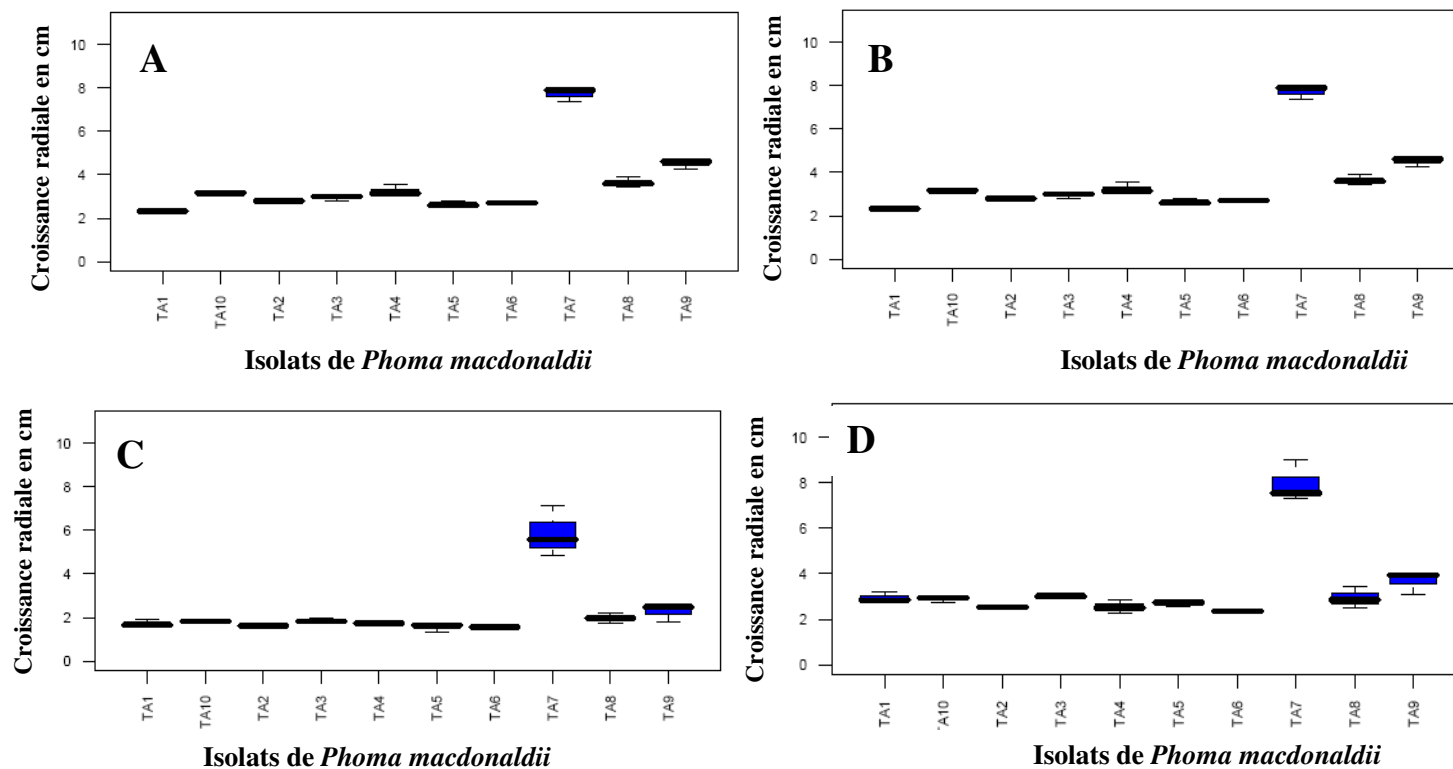


Figure (1) : croissance radiale en cm des isolats de *Phoma macdonaldii* sauvages.

A : isolats sauvages sur milieu PDA après 4 jours de culture.

B : isolats sauvages sur milieu PDA après 7 jours de culture,

C : isolats sauvages sur milieu V8 après 4 jours de culture .

D : isolats sauvages sur milieu V8 après 7 jours de culture

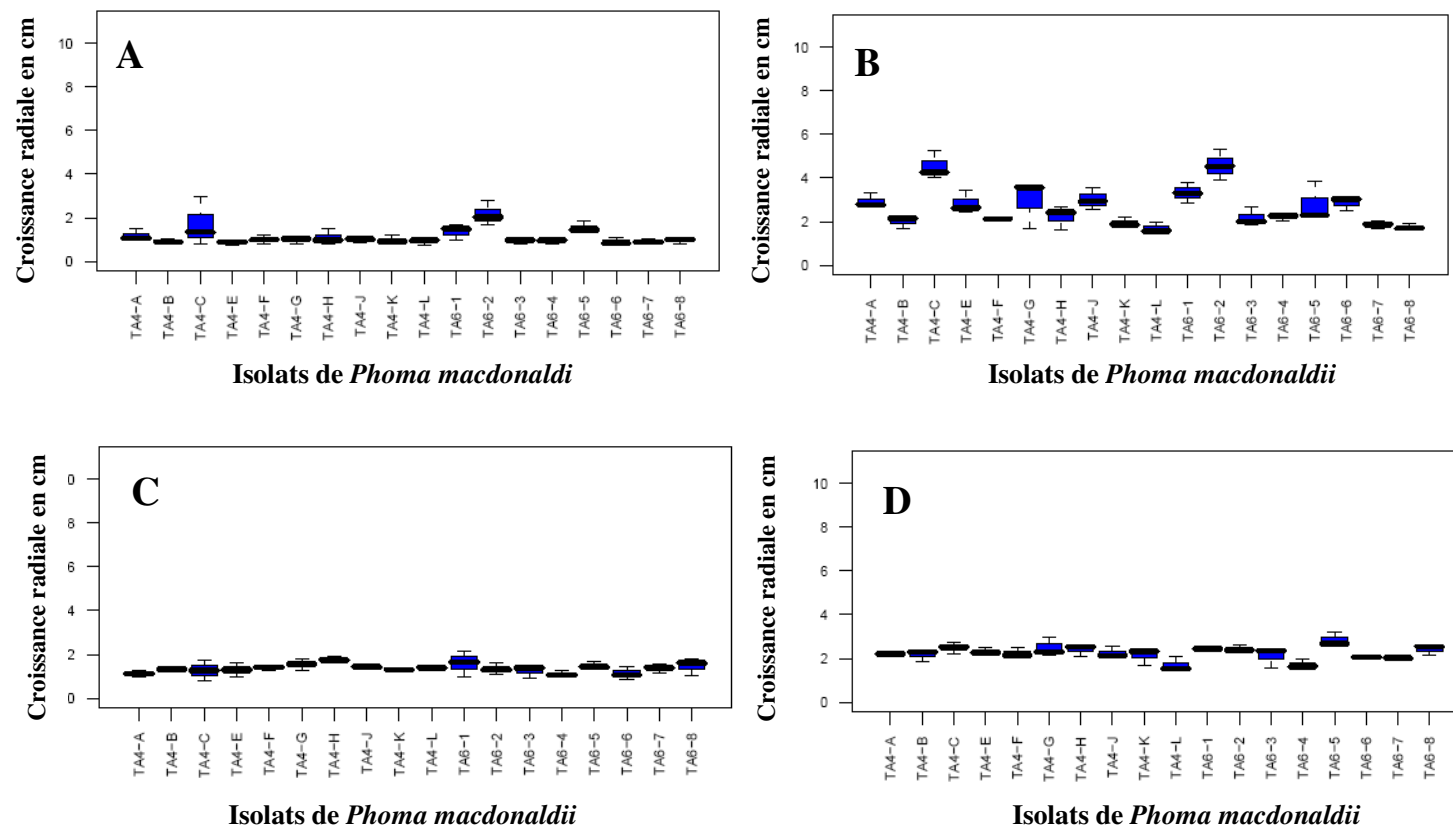


Figure (2) : croissance radiale en cm des isolats de *Phoma macdonaldii* GFP.  
A : isolats transformés sur milieu PDA après 4 jours de culture  
B : isolats transformés sur milieu PDA après 7 jours de culture,  
C : isolats transformés sur milieu V8 après 4 jours de culture .  
D : isolats transformé sur milieu V8 après 7 jours de culture

